



Lokalisierung funktioneller Marker im Rosengenom unter besonderer Berücksichtigung des Si-Systems

**Der naturwissenschaftlichen
Fakultät der Gottfried Wilhelm
Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des
akademischen Grades einer**

**DOKTORIN DER
NATURWISSENSCHAFTEN
-Dr. rer. nat. -**

**genehmigte Dissertation
von**

**Dipl. Biol. Manuela Bretzke
geboren am 10.02.1975 in Hannover**

2009

Referent: Prof. Dr. Thomas Debener
Koreferent: Prof. Dr. Helge Kuester
Tag der Promotion: 14.12.2009

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Zusammenfassung	II
Abstract	III
1. Einleitung	1
1.1 Lokalisierung genetischer Marker im Rosengenom	2
1.2 Ethylenempfindlichkeit von Rosen.....	3
1.2.1 Ethylenerkennung.....	4
1.2.2 Ethylenbiosynthese.....	5
1.3 Selbstinkompatibilität.....	7
1.3.1 Sporophytische Selbstinkompatibilität	9
1.3.2 Gametophytische Selbstinkompatibilität.....	9
1.4 Ziele der Arbeit.....	20
2. Material	21
2.1 Pflanzenmaterial	21
2.2 Sonstige Materialien.....	23
3 Molekularbiologische Methoden	23
3.1 DNA-Extraktion.....	23
3.2 RNA-Extraktion.....	23
3.3 Aufreinigung und Fällung von Nukleinsäuren.....	24
3.3.1 Quantifizierung von Nukleinsäuren	24
3.4 Agarose-Gelelektrophorese	24
3.6 Polymerase-Kettenreaktionen	25
3.6.1 PCR-Primer	25
3.6.3 PCR-Standardprogramm:	25
3.6.4 Gradienten-PCR	26
3.7 RACE.....	26
3.7.1 3`RACE.....	26
3.7.2 5`RACE.....	27
3.8 Genome Walking	27
3.9 Eluierung von PCR-Produkten	29
3.10 RT-PCR und Expressionsanalyse	29
3.11 Molekulare Marker.....	30
3.11.1 SSCP-Analyse (Single-Strand Conformational Polymorphism)	30

3.11.2	CAPs (Cleaved amplified polymorphism)	32
3.11.3	Mikrosatelliten.....	32
3.12.	Kartierungssoftware	32
3.13	BACs (Bacterial Artificial Chromosome).....	33
3.12.1	Vorbereitung der BAC-Filter	33
3.12.2	Hybridisierung.....	33
3.12.3	Vermehrung und Isolierung der BAC-Klone	34
3.12.4	Isolierung von BAC-Enden	34
3.13	Insert-PCR und Plasmid-Isolation.....	34
3.14	Sequenzierung.....	35
3.15	Phänotypische Untersuchungen zur Ethylenempfindlichkeit	36
3.16	Verwendete Software	38
4.	Ergebnisse	39
4.1.	Ethylenempfindlichkeit von Rosenblättern	39
4.1.1	Phänotypische Untersuchungen zur Ethylenempfindlichkeit	39
4.1.2	Kartierung von Strukturgenen zum Ethylenstoffwechsel	42
4.1.3	QTL-Analyse.....	46
4.2.	Selbstinkompatibilität.....	49
4.2.1	Kreuzungsdaten	50
4.2.2	Molekularbiologische Untersuchung des Si-Locus in Rosen	54
4.3	Rosenkopplungskarte der Population 94/1	75
4.4	Erweiterung der Rosenkopplungskarte 97/7	79
5.	Diskussion	81
5.1	Ethylenempfindlichkeit.....	81
5.2	Selbstinkompatibilität.....	85
5.3	Erweiterung der Kopplungskarte 97/7	93
5.4	Abschliessende Zusammenfassung	94
6.	Literaturverzeichnis.....	95
	Abkürzungsverzeichnis.....	109
	Tabellenverzeichnis.....	110
	Abbildungsverzeichnis.....	111
7.	Anhang.....	113
7.1	Pufferlösungen und Kulturmedien	113
7.2	Bakterienstamm.....	115

7.3	Restriktionsenzyme und Hersteller	115
7.4	Hersteller	116
7.5	Primersequenzen.....	116
7.6	Poster.....	122

Zusammenfassung

Rosen gehören zu den fünf weltweit bedeutendsten Zierpflanzen und ihr jährlicher Umsatz beläuft sich auf ungefähr 24 Milliarden Euro (DEBENER & LINDE, 2009). Trotz der großen wirtschaftlichen Bedeutung ist ihr Genom noch wenig erforscht.

In dieser Dissertation werden drei Schwerpunkte untersucht. Das erste Themengebiet umfaßt die Haltbarkeit von Rosen, die besonders für Schnittrosen von großer Bedeutung ist. Es existieren bereits umfassende Arbeiten zur Haltbarkeit von Rosen (JOHNSON & ECKER, 1998; MA et al., 2005), die mit dieser Arbeit durch QTL-Analysen und Kartierung von Strukturgenen zur Ethylenbiosynthese und Ethylenerkennung ergänzt werden.

Die Haltbarkeit von Rosen wird von mehreren Genen reguliert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Haltbarkeit von Fiederblättern durch QTL-Analyse untersucht. Die QTL-Analyse bestand aus der Untersuchung des Abwurfs der Fiederblätter während einer Ethylenbegasungsdauer von sechs Tagen mit anschließender Kartierung des Merkmals mit MapQTL. Der Abwurf der Fiederblätter begann nach drei Tagen Begasung mit Ethylen und nahm bis zum sechsten Tag stetig zu. Die QTL-Kartierung ergab für Tag vier ein Signal auf der Kopplungsgruppe sechs beider Genotypen 93/1-117 und -119 und für 93/1-119 auch auf der Kopplungsgruppe sieben. Für Tag fünf wurde kein QTL-Signal ermittelt. Die Signale für Tag sechs nach Begasung haben sich ab dem vierten Tag langsam verstärkt und liegen aber erst ab Tag sechs über den durch Permutationstest ermittelten Schwellenwert. Die Signale befinden sich für beide Genotypen auf der Kopplungsgruppe drei und für den Genotyp 93/1-119 noch zusätzlich auf der Kopplungsgruppe fünf.

Außer der QTL-Analyse wurden auch Strukturgene zur Ethylenerkennung und Biosynthese für die Population 94/1 kartiert. Es konnten acht Loci für ACC Synthasen, fünf Loci für Ethylenrezeptoren und vier Loci für CTR auf den Kopplungsgruppen der Elternpflanzen 93/1-117 und -119 kartiert werden. Strukturgene, welche bei beiden Eltern kartiert werden konnten, sind auf den jeweils gleichen Kopplungsgruppen lokalisiert.

Desweiteren wurde das Vorhandensein eines gametophytischen Selbstinkompatibilitätssystem in Rosen untersucht, denn obwohl schon seit 1940 (RATSEK et al.) ein gametophytisches Selbstinkompatibilitätssystem für Rosen vermutet wird, wurde in dem Bereich noch nicht weiter geforscht.

Erste Hinweise auf ein GSI-System zeigten sich durch das Merkmal Blütenfüllung, welches in der Rosenpopulation 94/1 1:1 aufspaltet, während die Pflanzen der reziproken Kreuzungen fast nur gefüllte Blüten zeigen. Das Merkmal Blütenfüllung kartiert auf der Kopplungsgruppe drei und auch andere Marker der Kopplungsgruppe drei, wie die Mikrosatelliten Rh50 und Rh58 zeigen ein auffälliges Spaltungsmuster. Die zunächst kartierten Marker TE3 und TE4, welche homologe Sequenzen der ESTs (PP_LEa0010K05f und PP_LEa0013F14f) von der Si-Kopplungsgruppe der Referenzkarte TxE darstellen, kartieren auch bei der Population 94/1 auf der Kopplungsgruppe drei und zeigen ein sehr deutlich verschobenes Spaltungsmuster, welches ebenfalls in einer reziproken Kreuzung untersucht wurde, um zu belegen, dass dieses Spaltungsmuster durch ein GSI-System entsteht.

Rückkreuzungsversuche von 67 Individuen mit den Eltern 93/1-117 und 93/1-119 weisen ebenfalls auf das Vorhandensein eines GSI-Systems hin, da bei insgesamt drei verschiedenen Si-Allelen der Elternpflanzen, jedes Individuum mit der Mutterpflanze 93/1-119 kreuzbar ist, während nur die Hälfte aller Individuen nach Bestäubung mit dem Genotyp 93/1-117 einen Fruchtansatz zeigt.

Weitere Hinweise für das Vorhandensein eines gametophytischen Selbstinkompatibilitätssystem in Rosen fanden sich durch genetische Untersuchungen zur GSI-Komponenten SFB mittels dem Primerpaar Si15 (ROMERO et al., 2004). Die amplifizierte Sequenz stimmt mit Prunus-Sequenzen überein und zeigt in NCBI ausschließlich Übereinstimmungen zu anderen SFB-Proteinen. Durch Translation der DNA-Sequenz in eine Proteinsequenz konnten die ermittelten SNPs verschiedenen Haplotypen zugeordnet werden. Die Expressionsanalyse zeigt, dass die amplifizierte SFB-Sequenz ausschließlich in Pollen exprimiert wird.

Die wesentlichen Komponenten, TE3 und TE4, sowie die Mikrosatelliten Rh50 und Rh58 wurden auch in einer weiteren diploiden Rosenpopulation 97/7 kartiert.

In dieser Dissertation wurden neben den TE3 und TE4 Markern aus der TxE-Referenzkarte auch weitere ESTs für Syntänie-Untersuchungen kartiert. Es wurden ausnahmslos ESTs von der Si-Kopplungsgruppe der Referenzkarte gewählt, deren Kartierung in der Population 94/1 zeigten, dass es eine Neustrukturierung des oberen Abschnitts der Kopplungsgruppe drei der Population 94/1 gegeben hat.

Stichwörter: Gametophytische Selbstinkompatibilität, Ethylen, Genkarte

Abstract

Worldwide, roses belong to the five most significant ornamentals plants with an annual turnover of approximately 24 billion Euros (DEBENER & LINDE, 2009). In spite of the economical importance of roses little is known about their genome composition so far.

The main emphasis of this dissertation work is based on three key aspects. The first topic deals with the vase life of roses, which is of particular importance for cut roses. Complementing existing and comprehensive works in regard to the vase-life of roses (JOHNSON & ECKER, 1998, MA et al., 2005) the present work utilised QTL-analysis and mapping of structural genes responsible for ethylene biosynthesis and ethylene recognition.

The durability of roses is regulated by a number of genes. In the course of this project the vase life of leaves has been examined by QTL-analysis. The QTL analysis focused on leaf senescence during incubation with ethylene for six days with following mapping with MapQTL. Leaves started to drop after an ethylene incubation period of three days and increased to drop steadily until the sixth day. The fourth day showed resultant signals, which could be mapped on linkage group six of the examined genotypes 93/1-117 and -119, whereas genotype 93/1-119 also allowed mapping of signals on linkage group seven. QTL-signals could not be identified on the next day (day five). The signal on the sixth day after ethylene incubation have slowly increased since day four but have crossed the threshold, established by permutation-test, only on day six. The signals for both genotypes are found on linkage group three and for genotype 93/1-119 additionally on linkage group five.

Apart from the QTL analysis, structural genes have also been mapped for population 94/1 to identify locations for ethylene recognition and ethylene biosynthesis. Eight loci for ACC synthases, five loci for ethylene receptors and four loci for CTR could be mapped on the linkage groups for the genotypes of the parent plants. Structural genes, which could be mapped for both parents are located on the same linkage groups.

Another key aspect of this dissertation is to prove the existence of a gametophytic self-incompatibility system for roses, which has been suspected since 1940 (RATSEK et al., 1940), but has not been explored any further. First clues of an existing GSI-System are indicated by the passing on of the character double flower to other generations. While the rose population 94/1 segregates 1:1, reciprocal crosses show nearly all double flowers. The hereditary factor of double flower can be mapped on linkage group three. Other molecular markers located on the same linkage group, such as the microsatellites Rh50 and Rh58, also show distinctive segregation distortion.

The molecular markers TE3 and TE4, which are orthologues to *Prunus* ESTs (PP_LEa0010K05f and PP_LEa0013F14f) of the reference map TxE, mapped on the linkage group three for the population 94/1. They show a very conspicuously displaced segregation pattern which is analysed in the reciprocal crossing to verify that this segregation is a result of the GSI-system.

Further back crossing of 67 individuals with parents 93/1-117 and -119 underline the existence of a GSI-system in roses. While the parents 93/1-117 and 93/1-119 incorporate three different Si-alleles, only cross-breeding between population 94/1 and mother 93/1-119 results in fruit settings of all descendants whereas only 50% of cross bred descendants between population 94/1 and father 93/1-117 prove fertile.

Additional evidence for an existing GSI-system in roses could be obtained with genetical examination of SFB, a GSI component, using the primer pair (ROMERO et al., 2004). The amplified sequence could be successfully aligned with *prunus*-SFB sequences and analysis in NCBI indicates compliance to other SFB proteins. The detected SNPs can be associated with several haplotypes after translating the DNA sequence into that of a protein. The expression analysis demonstrates that the amplified SFB sequence are exclusively found in pollen.

The molecular markers TE3 and TE4 and the microsatellites Rh50 and Rh58 have also been mapped in another diploid rose population 97/7.

Apart from the molecular markers TE3 and TE4 further ESTs sequences from the Si-linkage group of the *prunus* reference map TxE have been mapped in population 94/1 for synteny examination in this dissertation work. Their mapping in the population 94/1 showed, that there was a restructuring of the upper part of the linkage group three of the population 94/1.

Key-Words: Self-incompatibility, ethylen, genetic map

1. Einleitung

Rosen zählen zu den bedeutendsten Zierpflanzen und es existiert inzwischen eine Vielzahl von über 10 000 Sorten von Schnitt- und Gartenrosen (GUDIN 2000). Demgegenüber stehen 150 – 200 wilde Rosenarten. Auch als Rosenöl oder Tee finden sie Verwendung, aber trotz ihres großen ökonomischen Wertes ist über die Vererbung phänotypischer Merkmale in Rosen noch nicht viel bekannt (HIBRAND-SAINT OYANT et al., 2008). Zu den wenigen bisher untersuchten Merkmalen gehören die Blütenfarbe und Blütenfüllung (DEBENER & MATTIESCH, 1999), Resistenz gegen Sternrußtau (LINDE et al., 2004, MALEK et al., 2000), QTLs zur Bestachelung (CRESPEL et al., 2002) und Resistenz gegenüber Mehltau (DUGO et al., 2005).

Im Gegensatz zu anderen Rosaceae wie z.B. *Prunus* (DIRLEWANGER et al., 2004), sind für Rosen nur einige wenige Genkarten veröffentlicht. Darunter sind auch Karten für die in dieser Arbeit verwendeten Populationen 94/1 und 97/7.

Tab.1: Genkarten von Rosen. In der Tabelle sind Literaturangaben zu einer tetraploiden und vier diploiden Rosen-Genkarten aufgelistet. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Populationen 97/7 und 94/1 für weitere Kartierungen verwendet.

Referenz	Ploidy	<i>Rosa spp.</i>
MALEK et al., 2000	diploid	Pop. 97/7
LINDE et al., 2004		
DEBENER & MATTIESCH 1999	diploid	<i>R. hybrida</i> , 93/1-119 x 93/1-117
YAN et al., 2005		Pop. 94/1
RAJAPAKSE et al., 2001	tetraploid	<i>R. rugosa</i> x <i>R. wichuraina</i>
HIBRAND-SAINT OYANT et al., 2008		
CRESPEL et al., 2002	diploid	<i>R. hybrida</i> x <i>R. wichuriana</i> Crep.
DUGO et al., 2005	diploid	<i>Blush Noisette</i> x <i>R. wichuriana</i>

Rosen eignen sich im Vergleich zu anderen mehrjährigen Ziergehölzen aufgrund ihres relativ kleinen Genoms, bei diploiden Rosen zwischen 0,78 bis 1,29 pg (YOKOYA et al., 2000), sowie geringer Chromosomenzahl ($x=7$) sehr gut für genetische Untersuchungen.

Da sich in einem tetra- oder polyploiden Genom eine Vielzahl von Allelen eines Gens befinden, ist die Erstellung einer Genkarte auf der Basis einer diploiden Population empfehlenswert. Diese kann bei der Erstellung einer Genkarte für tetraploide Populationen als Referenz dienen (DIRLEWANGER et al., 2004). Allerdings werden Rückkreuzungen bei diploiden Rosenpopulationen durch das Selbstinkompatibilitätssystem erschwert bzw.

verhindert, welches wiederum die genetischen Untersuchungen einschränkt. Zudem sind Beet- und Schnittrosen im Gegensatz zu den diploiden Wildrosen in der Regel tetraploid.

Genetische Untersuchungen unterstützen die Züchtung von neuen Merkmalen bzw. neuen Merkmalskombinationen. Da die heutigen Kulturosen lediglich aus ca. 11 der über 150 *Rosa* Arten entstanden sind, besitzen sie im Gegensatz zu Wildrosen auch nur eine bestimmte Auswahl an Allelen des gesamten Genpools von Rosen, so dass vorallem im Hinblick auf Resistenzzüchtungen die Untersuchung von Wildrosen nach entsprechenden Genen erfolgreich sein kann (GUDIN 2000, ZHANG 2003).

1.1 Lokalisierung genetischer Marker im Rosengenom

Die Kartierung von gartenbaulichen Merkmalen von Rosen in einer Genkarte ist für Pflanzenzüchter von erheblicher wirtschaftlicher Bedeutung. Mit Hilfe markergestützter Selektion kann analysiert werden, ob eine Pflanze ein erwünschtes Merkmal ausprägen kann. Dies ermöglicht den Züchtern eine bessere Auswahl zwischen den Kreuzungseltern und auch eine Analyse der Aufspaltung der erwünschten Merkmalen in der Nachkommenschaft.

Auch für Klonierungen von Genen ist eine Genkarte als Grundlage hilfreich, da molekulare Marker in der Positionsklonierung eingesetzt werden können. Auf diese Weise kann auch von Wildrosen genetisches Material durch Klonierungen oder Kreuzungen gezielt in Kulturosen eingebracht werden (LIEBHARD et al., 2003; RAJAPAKSE, 2003).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Strukturgene und Mikrosatelliten im Rosengenom lokalisiert. Die Strukturgene beziehen sich auf Merkmale zum Ethylenstoffwechsel von Rosen und zu dem bisher noch nicht wissenschaftlich belegten gametophytischen Selbstinkompatibilitätssystem von Rosen. Die Kartierung erfolgte in den diploiden Populationen 94/1 und 97/7.

Die erste Genkarte mit molekularen Markern für Rosen wurde von DEBENER & MATTIESCH 1999 veröffentlicht. Sie bestand aus 300 Markern für die Population 94/1, inklusive RAPDs und AFLPs und wurde von DEBENER et al. (2001) und YAN et al. (2005) noch mit weiteren Markern ergänzt. Die aktuellste Karte für die Population 94/1 besteht aus 520 molekularen Markern. Entsprechend des haploiden Satzes von sieben Chromosomen besteht die Karte aus sieben Gruppen pro Elter. Es wird ein Bereich von 487 bzw. 490 cM abgedeckt. Die kombinierte Karte der beiden Eltern resultiert in einer Gesamtlänge von 545 cM.

Eine Genkarte von Rosen mit einer hohen Dichte an molekularen Markern kann durch Vergleich mit anderen Genkarten als Referenzkarte für Syntänie-Untersuchungen zwischen

Pflanzenfamilien dienen. Die Lokalisation von Genen innerhalb des Genoms ist bei den meisten Pflanzenfamilien sehr ähnlich. Aus diesem Grund läßt sich für gesuchte Gene eine Vorhersage treffen, auf welcher Kopplungsgruppe oder in welcher Nachbarschaft von molekularen Markern sie lokalisiert sein könnten. Für *Prunus* existiert eine Referenzkarte (TxE), welche auf der Internetseite http://www.bioinfo.wsu.edu/cgi-bin/gdr/cmap/map_set_info?mapset_aid=43 zur Verfügung gestellt wird und bereits für Syntänie-Untersuchungen verwendet wurde (DIRLEWANGER et al, 2004, NISHITANI et al., 2007).

1.2 Ethylenempfindlichkeit von Rosen

Die Haltbarkeit von Rosen wird massgeblich von ihrer Reaktion auf das Phytohormon Ethylen beeinflusst (MA et al., 2005). Ethylen ist in einer Vielzahl von physiologischen Vorgängen in der Pflanze involviert (YANG & HOFFMANN, 1984; BLEEKER & KENDE, 2000). 1901 entdeckte NELJUBOW den sogenannten “Triple response“ durch eine Ethylenbegasung von etiolierten Erbsenkeimlingen, die daraufhin mit einer Hemmung des Längenwachstums, erhöhtem Dickenwachstum und einer Horizontallage des Sprosses reagierten. Dieses Phänomen diente dazu verschiedene Mutanten zu erkennen, mit denen die Ethylenerkennung und Biosynthese analysiert werden konnten. Einige Beispiele sind: *eto ethylene overproducer* (KIEBER et al., 1993), *ctr constitutive triple response* (ROMAN & ECKER 1995; WANG et al., 2004) und *etr ethylene resistant* (BLEECKER et al., 1988).

Die Ethylenproduktion ist sowohl vom Gewebetyp als auch vom Lebenszyklus und äußeren Faktoren, wie Verletzungen, Parasiten, Überflutung und anderen Stressfaktoren abhängig (JOHNSON & ECKER, 1998, KUTSCHERA, 2002).

Einige wichtige Funktionen von Ethylen sind:

- die Krümmung des Hypokotylhakens zum Schutz der Keimblätter unter der Erde,
- Einleitung der Fruchtreife und Abscission von Früchten,
- Blütenbildung und Seneszenz (MAYAK et al., 1981, REID et al., 1989), wobei Ethylen nicht als Auslöser der Seneszenz fungiert, diese aber erheblich beschleunigt,
- Pathogen-Abwehr (GU et al., 2000; SURPLUS et al., 1998; PELLINEN et al., 1999).

Aufgrund der Funktion des Phytohormons Ethylen bei der Haltbarkeit von Rosen, sollen in dieser Arbeit auch Strukturgene der Ethylenerkennung und Ethylenbiosynthese im Rosengenom lokalisiert werden.

XUE et al. (2008) untersuchten die Genexpression von verschiedenen ACC-Synthasen bei Rosen während der Seneszenz und fanden einen Anstieg der ACS2-Genexpression in Petalen. Auch die Expression der Ethylenrezeptoren variiert sowohl in der Rezeptor-Art als auch in dessen Ausprägung je nach Zelltyp, Lebenszyklus und Umweltfaktoren (MÜLLER et al., 2000a+b, SHIBUYA et al., 2002, XUE et al., 2008).

1.2.1 Ethylenerkennung

Es sind fünf verschiedene membrangebundene Ethylenrezeptoren von *Arabidopsis thaliana* bekannt (CHANG et al., 1993, HUA et al., 1995). Sie bestehen aus drei bzw. vier membrandurchspannenden Domänen mit der Ethylenerkennungsregion am N-terminalen Ende, einer Histidinkinase und einer Receiver Domäne am C-terminalen Ende (siehe nachfolgende Abbildung). Die Histidinkinaseaktivität ist nicht bei allen Rezeptoren vorhanden und es ist nicht geklärt, ob sie für die Ethylenerkennung entscheidend ist (ETHERIDGE, 2006) oder die Antwort auf die Ethylenbindung moduliert (GAMBLE et al., 2002; WANG et al., 2003).

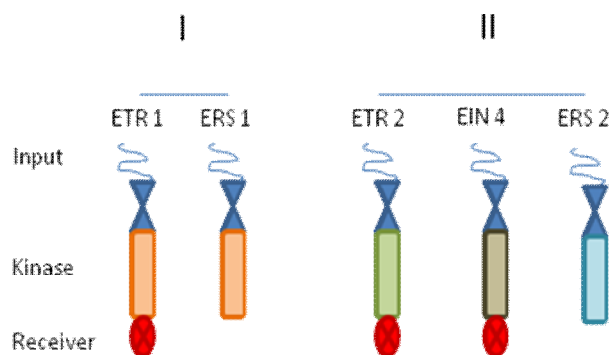


Abb. 1: Ethylenrezeptoren. ETR1 ähnliche Rezeptoren, bestehend aus ETR1 und ERS1 besitzen Histidinkinaseaktivität. Den ETR2 ähnlichen Rezeptoren fehlt die Histidinkinaseaktivität, stattdessen wird eine Serin/Threoninkinaseaktivität vermutet (FANKHAUSER et al., 1999). Die Rezeptoren ETR1, ETR2 und EIN4 besitzen eine Receiver Domäne und zeigen einen ähnlichen strukturellen Aufbau wie er von bakteriellen Zwei-Komponenten-Rezeptoren bekannt ist (PIRRUNG, 1999).

Die ETR1 ähnlichen Rezeptoren, zu denen ETR1 und ERS1 gehören, bilden Homodimere und besitzen Histidinkinaseaktivität (SCHALLER & BLEECKER, 1995), während die ETR2 ähnlichen Rezeptoren, zu denen ETR2, ERS2 und EIN4 gehören, keine Histidinaktivität aufweisen (WANG et al., 2002). Für letztere wird eine Serin/Threoninkinaseaktivität vermutet (FANKHAUSER et al., 1999; GAMBLE et al., 1998). Für die Erkennung des Phytohormons und der Einleitung der Ethylenantwort benötigen die Ethylenrezeptoren ein Kupfer-Ion, welches durch das RAN (Responsive to Antagonist) Protein gestellt wird (HIRAYAMA et al. 1999).

In der nachfolgenden Abbildung ist die Ethylenkaskade dargestellt. Die Ethylenrezeptoren aktivieren in Abwesenheit von Ethylen die Raf-like Kinase CTR1. CTR1 ist ein negativer Regulator und bewirkt im aktiven Zustand über MAP-Kinasen eine Phosphorylierung von EIN2 und damit einen Abbau der Transkriptionsfaktoren EIN3 und EIL über den Ubiquitin-

E3 Komplex (KIEBER et al., 1993, MÜLLER et al., 2002). Sobald Ethylen von den Rezeptoren gebunden wird, wird CTR1 inaktiviert und die Transkriptionsfaktoren EIN3 und EIL induzieren über weitere Transkriptionsfaktoren eine entsprechende Ethylenantwort (ETHERIDGE et al., 2006).

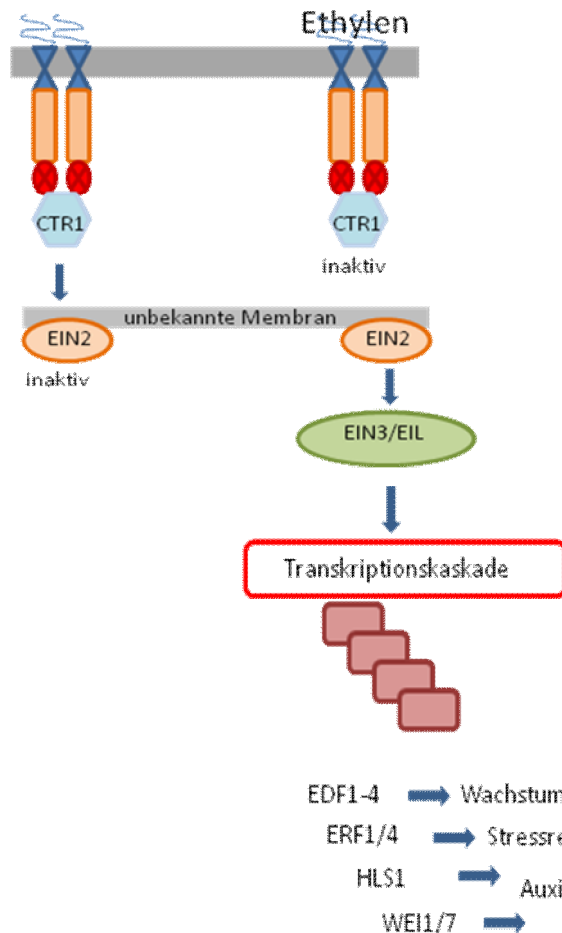


Abb. 2: Ethylensignalkaskade

Als Beispiel wurde der ETR1 Rezeptor (siehe auch vorherige Abbildung) dargestellt. Der ETR1 Rezeptor bildet Homodimere und aktiviert in Abwesenheit von Ethylen die Raf-like Kinase CTR1. CTR1 aktiviert MAP Kinasen, die EIN2 phosphorylieren und die Transkriptionsfaktoren EIN3/EIL werden durch den Ubiquitin-E3-Komplex abgebaut.

Durch Bindung von Ethylen wird CTR1 inaktiviert und die Transkriptionsfaktoren EIN3/EIL können eine Transkriptionskaskade auslösen (ETHERIDGE et al., 2006).

1.2.2 Ethylenbiosynthese

Die Ethylenbiosynthese wird von YANG & HOFFMANN (1984) im Yang-Zyklus (siehe nachfolgende Abbildung) dargestellt. Ausgangspunkt ist die Aminosäure Methionin (LIEBERMANN & MAPSON, 1964), aus der, katalysiert von der S-Adenosylmethionin-Synthase (SAM), S-Adenosylmethionin entsteht.

S-Adenosylmethionin stellt die Vorstufe für Aminocyclopropancarboxylsäure (ACC) dar. Dieser Vorgang wird von der ACC-Synthase katalysiert, die durch eine Multigenfamilie kodiert wird. Das entstandene ACC wird zum Teil von der ACC-Oxidase zu Ethylen oxidiert bzw. von der ACC-N-Malonyl-Transferase zu N-Malonyl-ACC erweitert.

ACC stellt außerdem für weitere Entfernungen, z.B. bei Staunässe von der Wurzel zum Blatt, die Transportform des Ethylen dar. Ethylen selbst benötigt für kürzere Distanzen keinen aktiven Transport, da das Gas durch die Interzellularräume der Gewebe diffundieren kann.

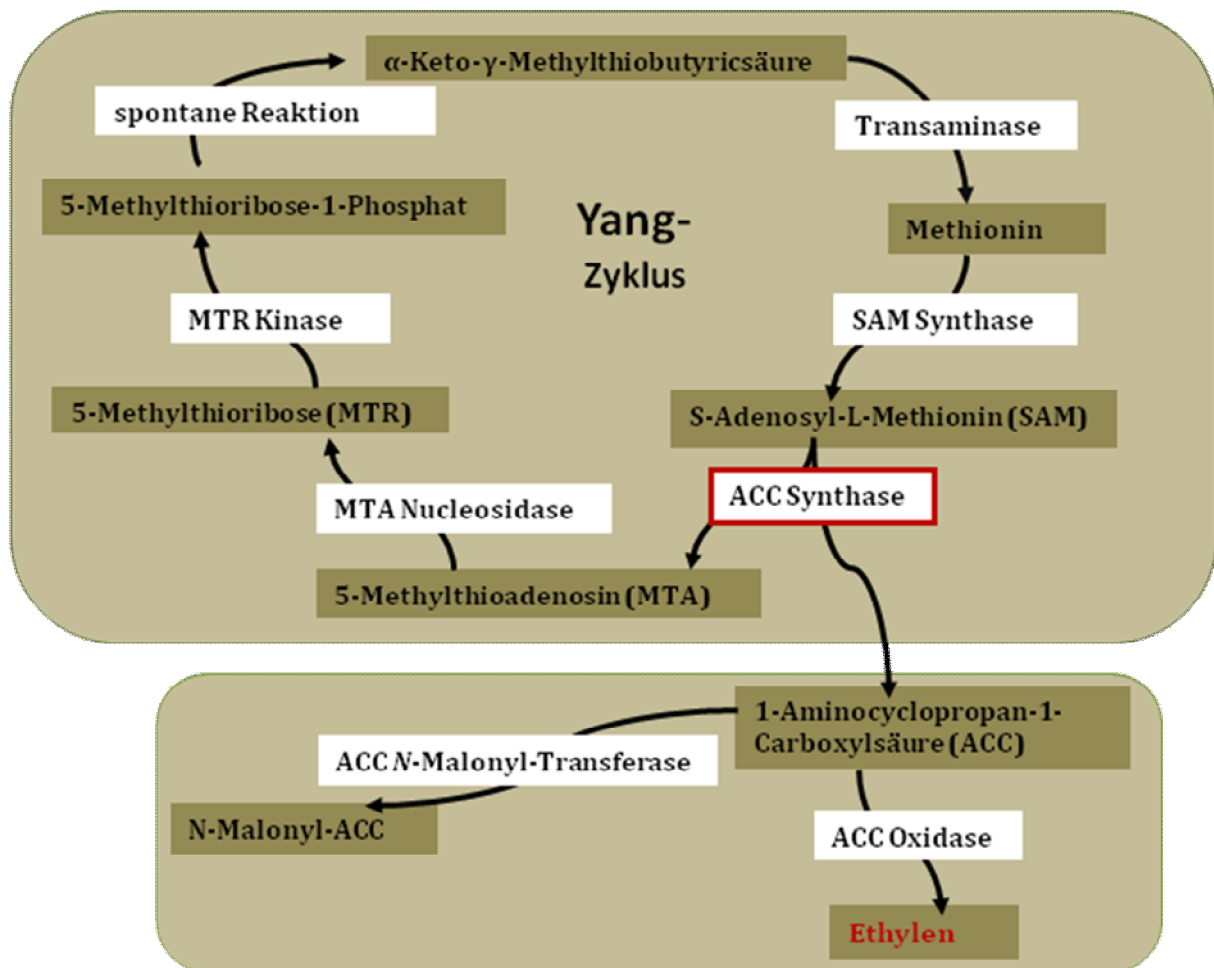


Abb. 3: Ethylenbiosynthese. Der Yang-Zyklus beginnt mit Methionin (LIEBERMANN & MAPSON, 1964), welches über 5-Methylthioadenosin regeneriert wird. Reaktionsbestimmender Schritt ist die Umwandlung von SAM zu ACC durch die ACC-Synthase. Die ACC-Synthase wird durch eine Multigenfamilie kodiert und stellt eine Kontrollinstanz der Ethylenantwort dar (YANG & HOFFMANN, 1984).

Im Rahmen dieser Arbeit sollen in Bezug auf die Ethylenbiosynthese die Loci für die ACC-Synthasen kartiert werden, da eine Erhöhung der Ethylenbiosynthese über eine Aktivierung der ACC-Synthase erfolgt.

1.3 Selbstinkompatibilität

Angiospermen sind mit Abstand die erfolgreichsten Landpflanzen und dominieren in der weltweiten Vegetation mit bis zu 300.000 Arten (HISCOCK, 2002). Ein wesentlicher Bestandteil ihres Erfolges liegt darin begründet, dass sowohl die eigene Bestäubung der Blüte als auch die Verbreitung ihres eigenen Pollens durch einen einzigen Insektenbesuch stattfinden kann.

Das setzt die Ausbildung von perfekten Blüten voraus. Diese Morphologie (Antheren und Griffel in einer Blüte) führt häufig zur Selbstbefruchtung (Autogamie), die auf Dauer in einer negativen genetischen Fitness (Inzuchtdepression) enden würde, da heterozygot rezessiv vorhandene negative Eigenschaften exprimiert und die Nachkommen dadurch benachteiligt werden. Im Verlaufe der Evolution konnten sich daher Pflanzen bevorzugt vermehren, die eine Autogamie ganz oder teilweise durch ein Selbstinkompatibilitätssystem verhindern können. Damit wird die Allogamie (Fremdbefruchtung) gewährleistet, die durch Neukombination von Erbfaktoren die genetische Variabilität und auch Heterozygotie erhöht und damit eine verbesserte Anpassung an die Umweltbedingungen gewährleistet (DE NETTANCOURT, 2001).

Schon Charles DARWIN (1876) konnte feststellen, dass sich mehr als die Hälfte aller Blütenpflanzen nicht mit ihren eigenen, aber sehr wohl mit Pollen anderer Pflanzen derselben Art bestäuben lassen. Im Gegensatz zu asynchroner Blühzeit (Protandrie oder Proterogynie) oder Diöcie bei imperfekten Blüten, spricht man hier von genetischer Selbstinkompatibilität. Bei der genetischen Selbstinkompatibilität können drei grundlegende Mechanismen unterschieden werden, von denen zwei als gametophytische Selbstinkompatibilität zusammengefasst werden und der dritte Mechanismus als sporophytische Selbstinkompatibilität bezeichnet wird. Für die sporophytische Selbstinkompatibilität sind die Exine der Pollenoberfläche für die Erkennungsreaktion entscheidend. Die Exine sind diploiden Ursprungs und damit beeinflussen beide Allele des Sporophyten die Si-Reaktion. Richtet sich die Si-Reaktion gegen den auskeimenden haploiden Pollenschlauch, dann handelt es sich um gametophytische Selbstinkompatibilität. In der nachfolgenden Abbildung werden die gametophytische und sporophytische Selbstinkompatibilität gegenübergestellt.

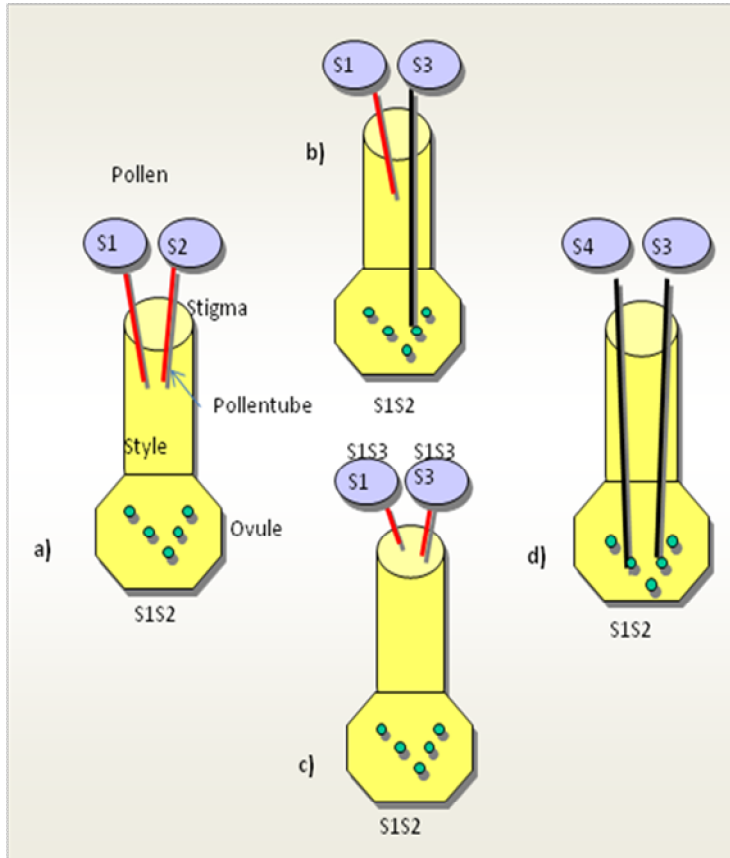


Abb. 4: Genetische Selbstinkompatibilität

Dargestellt sind Griffel und Pollen mit jeweils unterschiedlichen Allelkombinationen.

a) Entsprechen die Allele des Pollens einem Allel der Mutterpflanze (Autogamie), dann findet bei beiden Selbstinkompatibilitätssystemen keine Befruchtung statt.

b) **Gametophytische Selbstinkompatibilität:** Trägt der Pollen ein vom Griffel verschiedenes Allel, so führt das zum Fruchtansatz, auch wenn sich die Genotypen der Eltern nicht komplett unterscheiden (z.B. bei einer Kreuzung innerhalb einer Nachkommenschaft). Entscheidend ist nur das Allel des Pollens und die Allele des Griffels.

c) Bei der **sporophytischen Selbstinkompatibilität** ist der Genotyp der Pollenspenderpflanze (dargestellt auf der Pollenoberfläche) entscheidend, so dass auch ein Pollen mit einem vom Griffel unterschiedlichen Allel nicht zum Fruchtansatz führt, wenn sich die Genotypen der Eltern in einem Allel gleichen.

d) Ist der Genotyp der Pollenspenderpflanze von der Mutterpflanze in allen Allelen verschieden (Allogamie), so findet bei beiden Selbstinkompatibilitätsformen eine Befruchtung statt.

Pollen \ Griffel	S1	S2
S1	--	--
S1S2	--	--
S2	--	--
S1S2	--	--

Pollen \ Griffel	S1	S3
S1	--	S1S3
S1S2	--	S1S3
S2	--	S2S3
S1S2	--	S2S3

Pollen \ Griffel	S3	S4
S1	S1S3	S1S4
S1S2	S1S3	S1S4
S2	S2S3	S2S4
S1S2	S2S3	S2S4

Abb. 5: Die gametophytische und sporophytische Selbstinkompatibilität dargestellt in Punnett Squares.

a) Punnett Square für **gametophytische** und **sporophytische Selbstinkompatibilität** bei Autogamie. In beiden Fällen findet keine Befruchtung statt.

b) Ein Beispiel eines Punnett Square für **gametophytische Selbstinkompatibilität** bei Kreuzung einer Nachkommenschaft. Das Allel S3 kommt im diploiden Genom des Griffels nicht vor und führt zum Fruchtansatz.

c) Punnett Square für eine Fremdbestäubung, die sowohl bei **gametophytischer** als auch bei **sporophytischer Selbstinkompatibilität** zu neuen Genotypen führt.

Bei der gametophytischen Selbstinkompatibilität führt die Bestäubung zwischen Pflanzen einer Nachkommenschaft zum Fruchtansatz, sofern sie sich in einem Allel unterscheiden (Abb. 5).

Bei der sporophytischen Selbstinkompatibilität müssen sich beide Allele unterscheiden und eine Bestäubung innerhalb einer Nachkommenschaft führt bei kodominanter Ausprägung der S-Allele zu keinem Fruchtansatz.

1.3.1 Sporophytische Selbstinkompatibilität

Bei der sporophytische Selbstinkompatibilität wird die heteromorphe SSI von der homomorphen SSI unterschieden. Die Genotypen der heteromorphen sporophytischen Selbstinkompatibilität können durch äußere morphologische Merkmale, wie z.B. unterschiedliche Griffellängen unterschieden werden. Für die homomorphe sporophytische Selbstinkompatibilität (z.B. Brassicaceae) und gametophytische Selbstinkompatibilität der Rosen, sind keine morphologisch unterscheidbaren Si-Genotypen vorhanden und sie können nur durch genetische Analyse oder Kreuzungsversuche ermittelt werden (DE NETTANCOURT, 2001).

1.3.2 Gametophytische Selbstinkompatibilität

Die gametophytische Selbstinkompatibilität (GSI) ist von 56 Pflanzenfamilien der Angiospermen, wie z.B. Solanaceae, Poaceae, Papaveraceae und Rosaceae bekannt (BREWBAKER 1957; DE NETTANCOURT 2001; IGIC AND KOHN, 2001; KAUFMANN 1991). Bisher wurden die Selbstinkompatibilitätssysteme von Solanaceae (*Lycopersicon*, *Nicotiana*, *Petunia* und *Solanum*), Rosaceae (*Malus*, *Prunus* und *Pyrus*) und Scrophulariaceae (*Antirrhinum*) bereits intensiv untersucht (KAO AND TSUKAMOTO, 2004). Ihr GSI-System beruht auf der Interaktion zwischen einer griffelspezifischen S-RNase (BREDEMEIJER AND BLAAS, 1981; ANDERSON et al., 1986; MCCLURE et al., 1989) und einem pollenspezifischen F-Box-Protein. Im Verlauf der GSI-Reaktion wird die RNA des Pollens degradiert. Das GSI vermittelnde F-Box-Protein wird als SLF *S-Locus-F-Box* bzw. SFB *S-haplotype-specific-F-Box* bezeichnet. Sowohl die S-RNase wie auch das SLF bzw. SFB sind auf einem Locus, dem S- (Self-Incompatibility) Locus, kodiert.

Das Selbstinkompatibilitätssystem bei Poaceae beruht auch auf einer durch eine S-RNase vermittelten Reaktion, aber für dieses System existieren mindestens zwei Loci, die als S- und Z-Locus (LUNDQVIST, 1964) bezeichnet werden. Für *Beta vulgaris* (LUNDQVIST et al., 1973) und *Ranunculus acris* (OSTERBYE, 1975) wurden sogar vier Loci nachgewiesen. Nur wenn die Allele für beide Loci übereinstimmen, kommt es zu einer Selbstinkompatibilitätsreaktion. Die einzelnen Komponenten sind noch weitgehend unbekannt (THOROGOOD et al., 2005; YANG et al., 2008).

Ein gänzlich anderes System wird bei Papaveraceae exprimiert. In dieser Pflanzenfamilie beruht das GSI-System auf einer Kalzium-Kaskade, die durch Degradierung des Pollen-Zytoskelettes zur Apoptose führt (THOMAS et al., 2006; FRANKLIN-TONG & FRANKLIN, 1992; LI et al., 2007; GEITMANN et al., 2004).

Im Nachfolgenden sollen vor allem die Komponenten des gametophytischen Si-Systems von Rosaceae und einige Theorien zum Ablauf der Si-Reaktion vorgestellt werden.

1.3.2.1 Die Griffelkomponente des GSI-Systems (S-RNasen)

Die für die Ribonuklease-Aktivität kodierende Region (DKLFTVHGLWPS und WxKHGxC) weist unter allen S-RNasen (HARING et al., 1990, IOERGER et al., 1991) und insbesondere auch zur RNase T₂ von *Aspergillus oryzae* (KAWATA et al., 1988, MCCLURE et al., 1989, SINGH et al., 1991, SASSA et al., 1996) eine große Ähnlichkeit auf (Abb. 6).

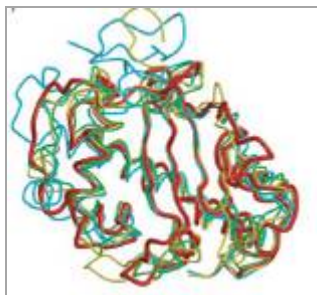


Abb. 6: Strukturvergleich verschiedener RNasen aus der T₂-Familie aus MATSUURA et al. (2001). Die S-RNase ist in rot, RNase RH in cyan, RNase LE in gelb und RNase MC1 in grün dargestellt.

Zu der T₂-S-RNase-Familie gehören auch S-like-RNasen und Relic S-RNasen. Erstere haben keine Allelspezifität und kommen sowohl in selbstinkompatiblen als auch in selbstkompatiblen Pflanzen vor. Relic S-RNasen sind den S-RNasen ähnlicher, werden auch nur im Griffel synthetisiert, aber kommen ebenfalls bei selbstinkompatiblen und selbstkompatiblen Pflanzen vor (KAO & TSUKAMOTO, 2004).

Bei den Si-vermittelnden S-RNasen handelt es sich um 30 kDa große Glykoproteine, die in die extrazelluläre Matrix des Griffels und in die innere Epidermis der Ovarien sezerniert werden (ANDERSON et al., 1986; CORNISH et al., 1987; ANDERSON et al., 1989; MCCLURE et al., 1993). Sie werden sowohl bei einer kompatiblen als auch inkompatiblen Bestäubung von Pollen aufgenommen (LUU et al., 2000), degradieren bei einer Selbstbefruchtung die RNA des Pollens und verhindern damit eine Befruchtung (MCCLURE et al., 1990; MURFETT et al., 1994; LEE et al., 1994; MATTON et al., 1997).

Zur Aufrechterhaltung der gametophytischen Selbstinkompatibilität ist ein hoher Gehalt an S-RNasen nötig (CLARK et al., 1990), der zwischen 10-50 mg/ml betragen kann (JAHNEN et al., 1989). Die hohe Konzentration (1,5 mM) und die Komplexbildung der S-RNasen (MCCLURE et al., 2000) lassen vermuten, dass kein spezifischer Rezeptor des Pollens für die Aufnahme der S-RNasen notwendig ist.

Für die Erkennung der Pollenkomponente SLF bzw. SFB ist nicht die Glykosylierung der S-RNase entscheidend, sondern vielmehr ihr Proteinrückgrat (HUANG et al., 1994; KARUNANANDAA et al., 1994; ISHIMIZU et al., 1999). Funktionsanalysen von KAO &

MCCUBBIN (1996) ergaben, dass die hypervariablen Bereiche, aber auch einige konservierte Regionen für die Allelspezifität verantwortlich sind. Kristall-Strukturanalysen von Solanaceae- und Rosaceae-S-RNasen zeigten, dass die hypervariablen Bereiche an der Oberfläche des Proteins liegen (IDA et al., 2001; MATSUURA et al., 2001).

Die Struktur der S-RNase besteht bei Solanaceae aus fünf konservierten Regionen, zwischen denen zwei hypervariable Bereiche liegen (IOERGER et al., 1991; TSAI et al., 1992).

Bei den Rosaceae sind nur vier konservierte Regionen bei den S-RNasen identifiziert worden (ISHIMIZU et al., 1998) und nur eine hypervariable Region (WANG et al., 2003). Bei *Prunus*, nicht aber bei *Pyrus* und *Malus*, wurde noch eine zweite hypervariable Region beschrieben, die auch bei Solanaceae nicht vorkommt (MA UND OLIVEIRA, 2002).

Für alle *Prunus* S-RNasen wurden zwei Introns gefunden, die jeweils zwischen den verschiedenen Haplotypen stark variieren (TAMURA et al., 2000; SONNEVELD et al., 2001; WÜNSCH AND HORMAZA, 2004), während bei *Pyrus* und *Malus*, sowie für Solanaceae jeweils nur ein Intron beschrieben wurde (TAO et al., 1999, 2006; YAMANE et al., 2000). Die nachfolgende Abbildung zeigt die genetische Struktur für S-RNasen bei Solanaceae (aus KAO & MCCUBBIN, 1996)

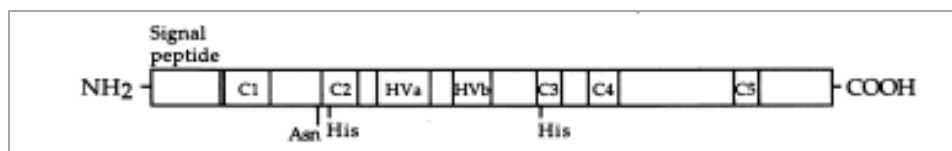


Abb. 7: Genetische Struktur von S-RNasen (Solanaceae) aus KAO & MCCUBBIN 1996. Abk.: C= Konservierte Region, HV= Hypervariable Region. Asparagin (Asn) ist eine N-Glykosylierungsstelle und die beiden Histidine sind für die RNase-Aktivität unerlässlich. Solanaceae-S-RNasen zeigen fünf konservierte Regionen, die durch variable Regionen unterbrochen werden. Zwischen der zweiten und dritten konservierten Region liegen zwei hypervariable Regionen.

S-RNasen sind höchst polymorph und weisen auch innerhalb einer Arten meist nur geringe Übereinstimmungen auf, wie z.B. bei zwei Solanaceae S-RNasen, die nur 38% Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz aufweisen (TSAI et al., 1992). Zu den konservierten Regionen gehört vor allem auch der Sequenzbereich, der für die Funktionalität als RNase notwendig ist (DKLFTVHGLWPS und WxKHGxC), sowie acht Cysteine, die vier Schwefelbindungen bilden (ISHIMIZU et al., 1998).

1.3.2.2 Die Pollenkomponente des GSI-Systems (SFB/SLF)

Die Pollenkomponente konnte erst deutlich später als die S-RNasen identifiziert werden. LAI et al. (2002) sequenzierten dazu die umliegende genomische Region des S-RNase-Gens und identifizierten dabei das S-Locus F-Box-Protein SLF. Spätere Analysen zur Alleldiversität von ENTANI et al. (2003) und USHIJIMA et al. (2003) und Transformationsversuche durch SIJACIC et al. (2004) bestätigten, dass es sich beim SLF um die Pollenkomponente handelt.

SLF gehört zu der F-Box-Protein-Familie, welche häufig als Adaptor zwischen einem Substrat und dem SCF-(Skp1-Cullin-F-Box)-E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex agieren. Polyubiquitinylierte Proteine werden durch 26S Proteasomen abgebaut. QIAO et al. (2004b) zeigten anhand eines Yeast-two-hybrid Systems, dass SLF-Proteine in *Antirrhinum* S-RNasen unspezifisch binden und mit Skp1 und Cullin-like-Proteinen einen SCF-Komplex bilden. Dieser Komplex ist allerdings mit 66 kDa kleiner als der typische SCF-Komplex mit 100 kDa. Außerdem wiesen QIAO et al. (2004b) nach, dass in kompatiblen Pollen von *Antirrhinum* S-RNasen abgebaut werden. Bei *Nicotiana* wiederum konnten GOLDRAJ et al. (2006) keine Degradierung von S-RNasen in kompatiblen Pollen nachweisen.

Die Region am Carboxylende des SLF/SFB zeigt die höchste Variabilität. Insgesamt besteht das SFB von *Prunus* aus vier variablen Bereichen ohne Introns (ROMERO et al., 2004).

1.3.2.3 Modifikator-Gene (modifier genes)

Für die Si-Antwort sind weitere Faktoren essentiell, die von MCCLURE et al. (2000) in drei Gruppen eingeteilt werden.

- Gruppe I: Proteine, welche direkt die Expression der S-Locus-Gene beeinflussen (z.B. Transkriptionsfaktoren).
- Gruppe II: Proteine, die wichtig für die Pollenerkennung sind, genetisch oder biochemisch mit S-Locus-Produkten interagieren, aber keine generelle Funktion während der Keimung ausüben.
- Gruppe III: Proteine, die ebenfalls wichtig für die Pollen-Erkennung sind, aber auch andere Funktionen während der Keimung übernehmen können.

Mutationen in Gruppe eins und zwei sollten zur Selbstkompatibilität und in Gruppe drei zur Sterilität führen.

Mittels Immunoblot-Analyse und cDNA-Klonierung wurden fünf Proteine in der extrazellulären Matrix von Griffeln gefunden, die sich *in-vitro* an S-RNasen binden und damit einen Einfluss auf die Si-Reaktion haben könnten. Das 11 kDa Protein wurde als Phytocyanin charakterisiert und als p11 bezeichnet (NERSSIAN et al., 1998). Beim 35 kDa Protein handelt es sich um eine S-RNase und es wird angenommen, dass S-RNasen Multimere bilden (MCCLURE et al., 2000; CRUZ-GARCIA et al., 2003). Die drei ca. 100 kDa großen Glykoproteine werden als Transmitting Tissue Specific glycoproteins TTS bezeichnet (CHEUNG et al., 1993, 1995; WU et al., 1995). Außerdem wurden ein 120 kDa Glykoprotein (LIND et al., 1994, 1996) und class III Pistil-specific Extensin-Like Proteins PELPIII (*N. tabacum*) bzw. NaMG-15 (*N. alata*) (CRUZ-GARCIA et al., 2003) identifiziert.

Sowohl TTS, 120 kDa als auch PELPIII interagieren mit Pollenkomponenten und haben daher eine Funktion bei der Pollenerkennung während der Bestäubung (HANCOCK et al., 2005). Darüber hinaus wird angenommen, dass diese fünf Proteine nicht nur bei der Selbstinkompatibilität involviert sind, sondern auch beim Pollenwachstum eine wichtige Funktion ausüben (CRUZ-GARCIA et al., 2003). Die Glykane des Arabinogalactanproteins TTS dienen dem Pollen beim Wachstum als Energiequelle und ohne TTS findet auch bei kompatiblen Pollen nur ein reduziertes Wachstum statt (CHEUNG et al., 1995; WU et al., 1995). PELPIII assoziiert mit Pollen und Kallose (DE GRAAF, 1999). Das 120 kDa Glykoprotein ist polymorph und wird vom Pollen ins Cytoplasma aufgenommen, weshalb ein direkter Einfluß auf die Si-Reaktion angenommen wird (LIND et al., 1996).

Ein zur Gruppe zwei zugeordnetes Protein, das HT-B, wurde von MCCLURE et al. (1999) in *Nicotiana alata* und später auch in *Solanum chacoense* (O'BRIEN et al., 2002) identifiziert. HT-B ist ein kleines (8,7 kDa, 79 AS) asparaginereiches Protein mit pI 4,67. Es besitzt keine N-Glykosylierung, aber sechs Cysteinreste, die in Schwefelbindungen involviert sein könnten (O'BRIEN et al., 2002). Das HT-B wird im Griffel exprimiert, aber es liegt keine Kopplung zum S-Locus vor (MCCLURE et al., 1999).

Sowohl für *Nicotiana alata* als auch für *Lycopersicon*-Arten (KONDO et al., 2002a+b) konnte nachgewiesen werden, dass HT-B für die Si-Reaktion notwendig ist. Ohne Expression von HT-B verhalten sich die Pflanzen selbstkompatibel und verlieren ihre Blüten erst deutlich später (O'BRIEN et al., 2002).

Expressionsanalysen haben gezeigt, dass sowohl S-RNasen als auch HT-B zum Zeitpunkt der Reifung der Antheren am Stärksten exprimiert werden (O'BRIEN et al., 2002; MATTON et al., 1998). CRUZ-GARCIA et al. (2003) stellten die Hypothese auf, dass das HT-B Protein bei der Aufnahme der S-RNasen in das Pollenzytoplasma entscheidend ist. HT-B ist das erste Modifikator-Gen, das kloniert worden ist und wurde bisher nur in *Nicotiana* und *Solanum* nachgewiesen, nicht dagegen für *Antirrhinum* und Rosaceae (MCCLURE, 2006).

Die unspezifischen GSI-Komponenten (HT-B, 120k, 4936-Faktor) sind für die Aufnahme der S-RNasen in das Pollenzytoplasma nicht erforderlich, wie GOLDRAIJ et al. (2006) mittels RNAi beweisen konnten. Es befanden sich S-RNasen auch im Pollenzytoplasma, wenn HT-B, 120k und 4936-Faktor fehlten. Eine zytotoxische Reaktion konnte allerdings erst dann nachgewiesen werden, als auch HT-B, 120k und 4936-Faktor vorhanden waren (GOLDRAIJ et al., 2006).

Mittels Yeast two-hybrid Untersuchungen zur Protein-Protein-Interaktion wurde das PhSBP1 Protein nachgewiesen, welches sich an S-RNasen bindet und am C-terminalen Ende ein RING-HC-Motiv trägt (SIMS AND ORDANIC, 2001; O'BRIEN et al., 2004). RING-HC-Proteine sind am Ubiquitin-abhängigen Proteinabbau beteiligt. PhSBP1 wird nicht nur im Griffel oder Pollen exprimiert, sondern auch in allen anderen getesteten Geweben und es zeigt keine Allelspezifität. Daher kann PhSBP1 keine spezifische Aufgabe in der Selbstinkompatibilitätsreaktion erfüllen. SONNEVELD et al. (2005) spekulieren, dass das RING-HC-Protein der allgemeine S-RNase-Inaktivator in Pollen sein könnte, wie er von einem der Inhibitor-Modelle für GSI vorausgesetzt wird.

1.3.2.4 GSI-Modelle

Zunächst wurde davon ausgegangen, dass nur im Falle einer inkompatiblen Bestäubung die S-RNasen mittels eines spezifischen Rezeptors in das Pollenzytoplasma aufgenommen werden (Gatekeeper-Modell). Spätere Analysen wiesen S-RNasen auch bei kompatiblen Bestäubungen im Pollenzytoplasma nach. Aufgrund dieser Entdeckung entstanden verschiedene Inhibitor-Modelle (LUU et al., 2000; QIAO et al., 2004a).

Beim Inhibitormodell (Abb. 8) wird ein S-RNase-Inhibitor vorausgesetzt, der den Pollen vor der Degradierung schützt. Nach LUU et al. (2000) handelt es sich bei Solanaceae dabei nicht um die Pollenkomponente SLF, sondern um ein weiteres Protein, eventuell das RING-HC-Protein (SONNEVELDT et al., 2005).

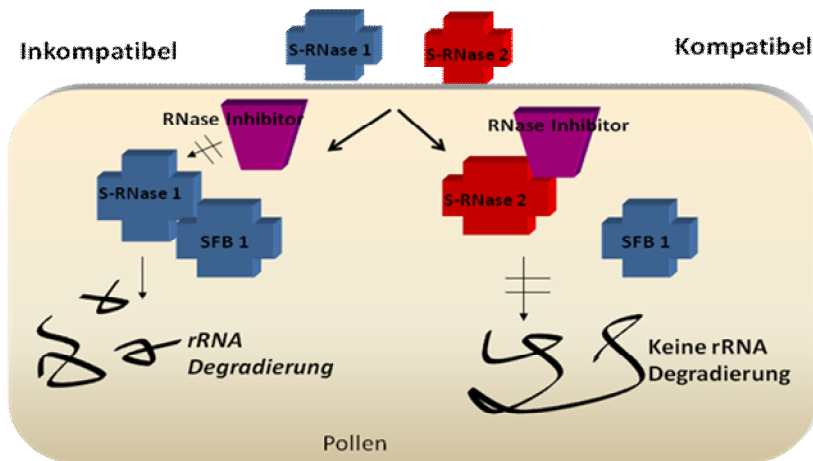


Abb. 8: Inhibitormodell nach LUU et al. (2000) für Solanaceae. Ein Inhibitor bindet an alle S-RNasen, sofern sie nicht von der Pollenkomponente SFB erkannt werden und schützt damit die Pollen-RNA vor Degradierung. Wird die S-RNase von SFB erkannt, wird die RNA des Pollens durch das Enzym degradiert und eine Befruchtung verhindert.

Es gibt aber auch Hinweise dafür, dass es sich bei dem Inhibitor um die Pollenkomponente SLF handeln könnte, die im Falle einer kompatiblen Reaktion die S-RNase für den Abbau durch den Ubiquitinkomplex markiert oder im Falle einer selbstinkompatiblen Reaktion, an eine andere Bindungsstelle der S-RNase bindet und damit ihre Funktionalität nicht beeinflusst (USHIJIMA et al., 2004).

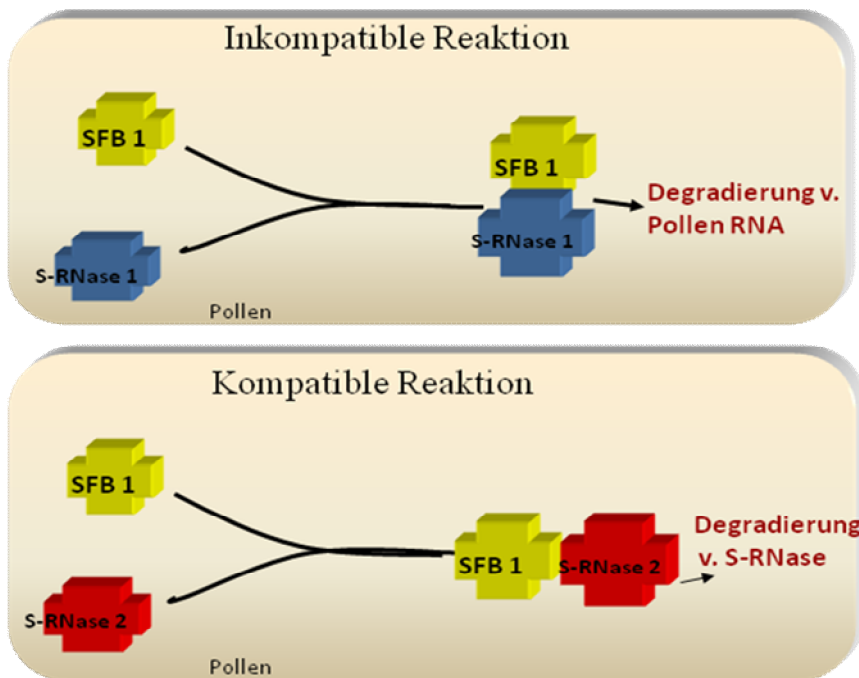


Abb. 9: Inhibitormodell nach USHIJIMA et al. (2004) für Prunus. Die Pollenkomponente SFB bindet an S-RNasen unterschiedlich. Handelt es sich um eine Selbstbestäubung, so schützt die Bindung von SFB die S-RNase vor Degradierung. Handelt es sich um eine Fremdbestäubung, wird die S-RNase durch die Bindung an SFB für den Proteinabbau markiert und damit die Pollen-RNA geschützt.

Für das Inhibitormodell nach LUU et al. (2000) spricht, dass ein RING-HC-Protein gefunden wurde, welches in GSI involviert ist und ein Bestandteil des Ubiquitinproteinabbau-Komplexes ist. Ein Hinweis für das Inhibitormodell nach USHIJIMA et al. (2004) (Abb. 9) ist,

dass QIAO et al. (2004b) nachgewiesen haben, dass AhSLF an alle S-RNasen bindet und ein Bestandteil des SCF-Komplexes in Pollen ist (ENTANI et al., 2003; QIAO et al., 2004a+b; SIJACIC et al., 2004; USHIJIMA et al., 2003+2004; TAKAYAMA AND ISOGAI 2005).

CHARLESWORTH et al. (2005) haben eine Hypothese aufgestellt, die das Phänomen erklärt, dass bei dem Auftreten von Polyploidie aus ehemals diploiden Pflanzen die Selbstinkompatibilitätsreaktion zusammenbricht (Abb. 10). Es wird davon ausgegangen, dass die Reaktion aufgrund der Heterozygotie des Pollens nicht zustande kommt. Die kompetitive Reaktion beruht auf der Erkennung aller Nicht-Selbst-RNasen durch das SLF-Protein, während die S-RNase unerkant bleibt. Handelt es sich um einen heterozygoten Pollen, dann liegen mindestens zwei verschiedene SLF-Proteine vor, so dass jede S-RNase von einem SLF-Protein erkannt wird. Dadurch wird die Degradierung der Pollen-RNA durch die S-RNase verhindert und eine Si-Reaktion findet nicht statt.

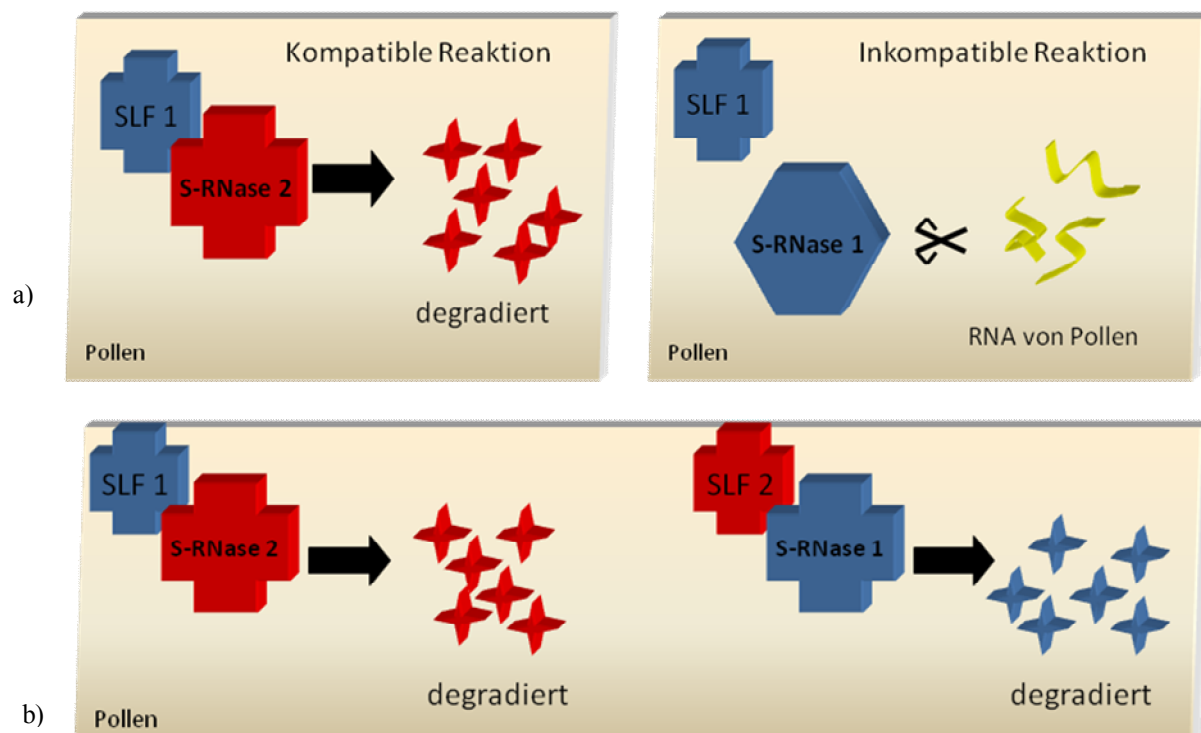


Abb. 10: Kompetitive Si-Reaktion nach CHARLESWORTH et al. (2005). In einem haploiden Pollen liegt nur eine Version des SLF-Proteins vor (a). Das SLF erkennt alle Nicht-Selbst-RNasen, während die S-RNase unerkant bleibt und zur Degradierung der Pollen-RNA führt. Sind in einem Pollen mehr als eine SLF-Version vorhanden (Heterozygotie), dann werden alle S-RNasen erkannt und es findet keine Si-Reaktion statt.

GOLDRAIJ et al. (2006) untersuchten die Lokalisierung des 120k Glykoproteins und der S-RNase mittels markierter Antikörper im Pollenzytoplasma (Abb. 11). Sie fanden heraus, dass das 120k Glykoprotein einen Bereich im endoplasmatischen Membransystem des Pollenschlauches markiert. In diesem Kompartiment befinden sich die S-RNasen. Im Falle von

Selbstinkompatibilität zeigten 80% der Pollen nach ca. 36h eine veränderte Morphologie mit lysierten Vakuolen. In Mutanten, die kein HT-B oder 4936-Faktor im Pollen aufwiesen, blieben die Vakuolen intakt (GOLDRAIJ et al., 2006). Zudem konnte nachgewiesen werden, dass die Konzentration an HT-B in kompatiblen Pollen im Gegensatz zu inkompatiblen Pollen stark abnahm.

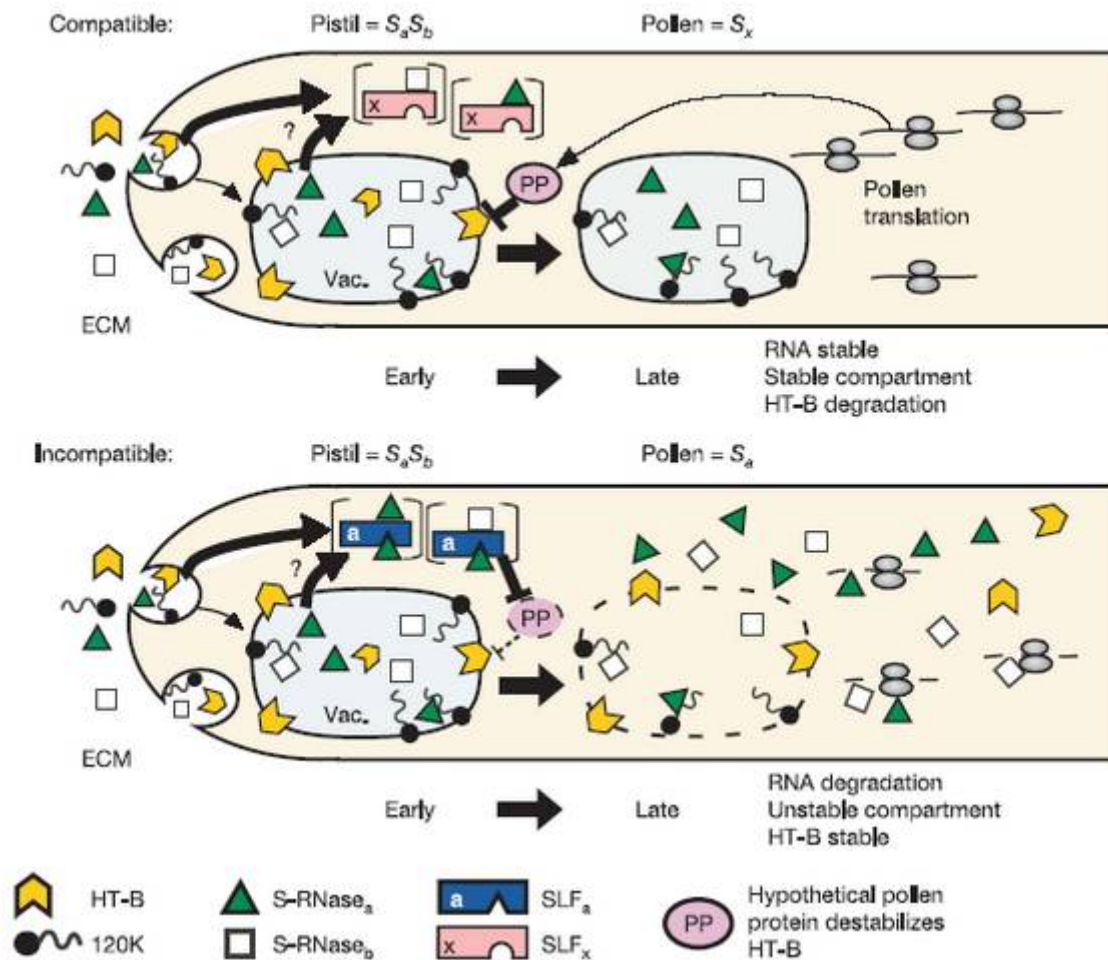


Abb. 11: Hypothese zum Selbstinkompatibilitätsmechanismus nach GOLDRAIJ et al. (2006). Die S-Rnasen werden in Vakuolen aufgenommen. Das 120k Protein und HT-B sind in der Vakuolenwand eingebettet. Nur wenn das 120k Protein und HT-B vorhanden sind, kann eine Si-Reaktion stattfinden. Bei einer kompatiblen Reaktion wird HT-B abgebaut, während eine inkompatiblen Reaktion zur Lyse der Vakuole und damit zur Freisetzung der S-RNase führt.

1.3.2.5 Organisation des S-Locus

Eine wichtige Voraussetzung für die Funktionalität der gametophytischen Selbstinkompatibilität, ist, dass die Pollen- und Griffelkomponenten gemeinsam vererbt werden, da sonst keine Selbsterkennung stattfinden kann und die Nachkommen somit selbstkompatibel würden. ENTANI et al. (1999) fanden für *Petunia hybrida* heraus, dass der S-Locus im Zentromer liegt. Das Zentromer weist nur eine geringe bis keine Rekombination auf, wodurch eine gemeinsame Vererbung der Pollen- und Griffelkomponente gewährleistet

wäre. Außerdem liegen die beiden Komponenten auf dem Chromosom sehr dicht zusammen, so dass die Wahrscheinlichkeit einer Trennung z.B. durch Crossing over gering ist. ROMERO et al. (2004) ermittelten einen maximalen Abstand von < 49kb zwischen dem Genort der S-RNase und SFB für *Prunus*. Das SFB ist bei einigen *Prunus*-Arten in umgekehrter Orientierung zur S-RNase im Chromosom lokalisiert (ENTANI et al., 2003; USHIJIMA et al., 2003; ROMERO et al., 2004; SONNEVELD et al., 2005).

Sowohl Sequenzvergleiche zwischen verschiedenen SFB- als auch S-RNase-Allelen zeigten häufig innerhalb einer Art weniger Gemeinsamkeiten als zwischen verschiedenen Arten (USHIJIMA et al., 1998; KAO AND TSUKAMOTO, 2004; CHENG et al., 2006) (Abb. 12).

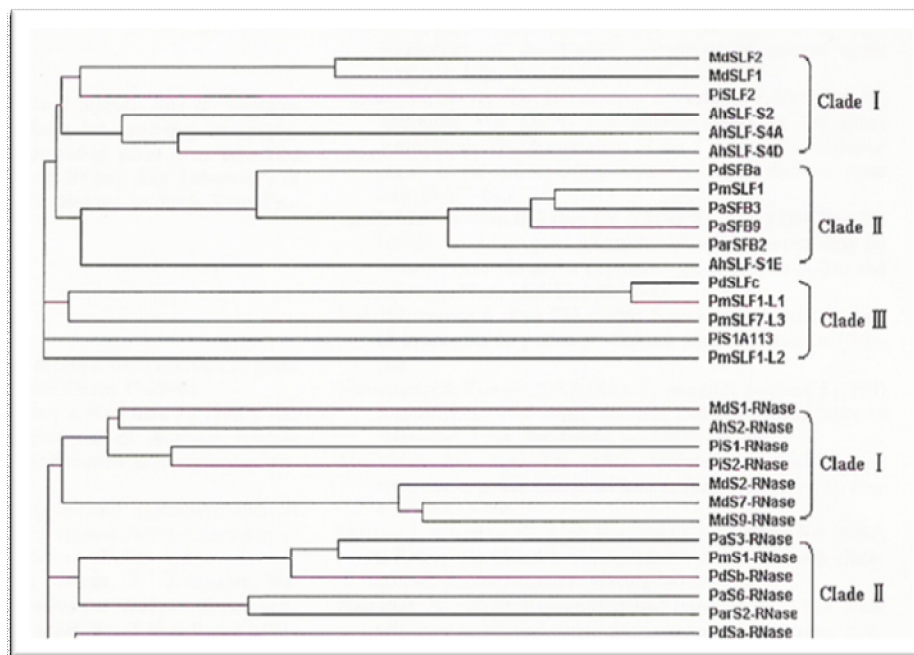


Abb. 12: Stammbäume von SLF-Proteinen und S-RNasen aus CHENG et al. (2006). Sowohl S-RNasen als auch SLF-Proteine zeigen zum Teil eine engere Verwandtschaft zwischen Arten verschiedener Familien als innerhalb derselben Familie

SAVAGE & MILLER (2006) fanden heraus, dass zwei S-RNasen-Allele von *Lycopersicon parishii* mit denen von *L. andersonii* übereinstimmen. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass das GSI-System noch vor der Trennung der Arten bestanden hat (USHIJIMA et al., 1998). Man spricht bei diesem Phänomen von transspezifischer oder transgenetischer Evolution (IOERGER et al., 1990).

Wechsel von Selbstinkompatibilität zur Selbstkompatibilität

Bei Solanaceae kommt es zum Wechsel zwischen SI (Selbstinkompatibel) und SC (Selbstkompatibel), sobald die Pflanzen polyploid werden (LIVERMORE AND JOHNSTONE, 1940; PANDEY, 1968), während dies für *Prunus* nicht gilt (HAUCK et al., 2006). Der Wechsel bei Solanaceae beruht auf kompetitiver Interaktion, bei der heterozygote Pollen zwei SLF-Versionen ausprägen und jede S-RNase erkannt und inhibiert wird (LEWIS 1943; GOLZ et al.,

1999, 2001). Die Hypothese zur kompetitiven Interaktion nach CHARLESWORTH et al. (2005) ist im vorherigen Kapitel genauer dargestellt worden. Bisherige Untersuchungen zeigten, dass eine Duplikation des S-Locus bei *Nicotiana glauca* (GOLZ et al., 1999, 2001) und *Petunia axillaris* (TSUKAMOTO et al., 2005) zur Selbstkompatibilität führt.

SFB in *Prunus* weist eine wesentlich höhere Diversität auf als SLF von Solanaceae (IKEDA et al., 2004; SIJACIC et al., 2004). Bei Solanaceae scheint es nicht zur Ausbildung von funktionsfähigen Pollen zu kommen, wenn eine Deletion im SLF-Gen vorliegt (GOLZ et al., 2001).

Bei *Prunus* führt eine Deletion bzw. Mutation im SFB-Gen zur Selbstkompatibilität (USHIJIMA et al., 2004; SONNEVELD et al., 2005). Die bisherigen Untersuchungen lassen darauf schließen, dass sich die Selbstinkompatibilitätssysteme von Solanaceae und Rosaceae unterscheiden.

Bei *Prunus cerasus* L. kommen sowohl selbstinkompatible wie selbstkompatible Arten vor (CRANE & LAWRENCE, 1929) und bei Kreuzungen zwischen zwei selbstkompatiblen Arten, können Nachkommen auftreten, die selbstinkompatibel sind (LANSARI & IEZZONI, 1990). Letzteres ist ein Hinweis darauf, dass die Selbstinkompatibilitätsgene bei den SC-Arten nicht verloren gegangen sind (YAMANE et al., 2003).

Außerdem kann es auch durch Mutationen bei den Modifikator-Genen zur Ausprägung einer Selbstkompatibilität kommen (MCCLURE et al., 1999).

Entstehung neuer Si-Allele

Die Entstehung neuer Si-Allele erfolgt nach MATTON et al. (1999) über dualspezifische Allele. Dadurch, dass die S-RNasen ihre ursprüngliche Spezifizierung zunächst noch behalten und gleichzeitig schon eine neue ausprägen, führt die Entstehung neuer Si-Allele nicht zu einem Zusammenbruch des GSI. Würden die S-RNasen keine Dualspezifität ausbilden, müsste die Pollenkomponente gleichzeitig mit der S-RNase mutieren, damit es nicht zum Verlust des GSI führt. Diese Gen-nach-Gen-Mutation ist auch von Resistenzgenen bekannt (THOMPSON & BURDON, 1992). Die neuen Allele können sich aufgrund balancierter Selektion („balancing selection“) sehr schnell etablieren, da seltene Allele bevorzugt zu Nachkommen führen (WRIGHT, 1939). Auf diese Weise kann in einer Population im Gegensatz zu Allelen für neutrale Merkmale ein selten gewordenes Si-Allel nicht verloren gehen und gleichzeitig wird eine große Vielfalt an Si-Allelen sichergestellt (RIDOUT et al., 2005).

1.4 Ziele der Arbeit

Das Hauptziel dieser Arbeit ist, molekulare Marker für die Ethylenempfindlichkeit und Selbstinkompatibilität von Rosen in einer Genkarte zu lokalisieren. Hierzu sollen sowohl genetische Untersuchungen zur Ethylenempfindlichkeit als auch phänotypische Analysen mittels Ethylenbegasung durchgeführt werden. Zur Selbstinkompatibilität sollen Komponenten des Si-Systems kartiert und Kreuzungen ausgewertet werden. Für die Analysen wurde die diploide Rosenpopulation 94/1 verwendet.

Die zweite Genkarte bezieht sich auf die Population 97/7, in der einige Mikrosatelliten kartiert werden sollen, damit die beiden Genkarten der Populationen 94/1 und 97/7 miteinander vernetzt werden können. Desweiteren diente die zweite Kreuzungspopulation dazu, Marker zu kartieren, die in der Population 94/1 nicht polymorph sind.

In der nachfolgenden Abbildung werden die Ziele der Arbeit dargestellt.

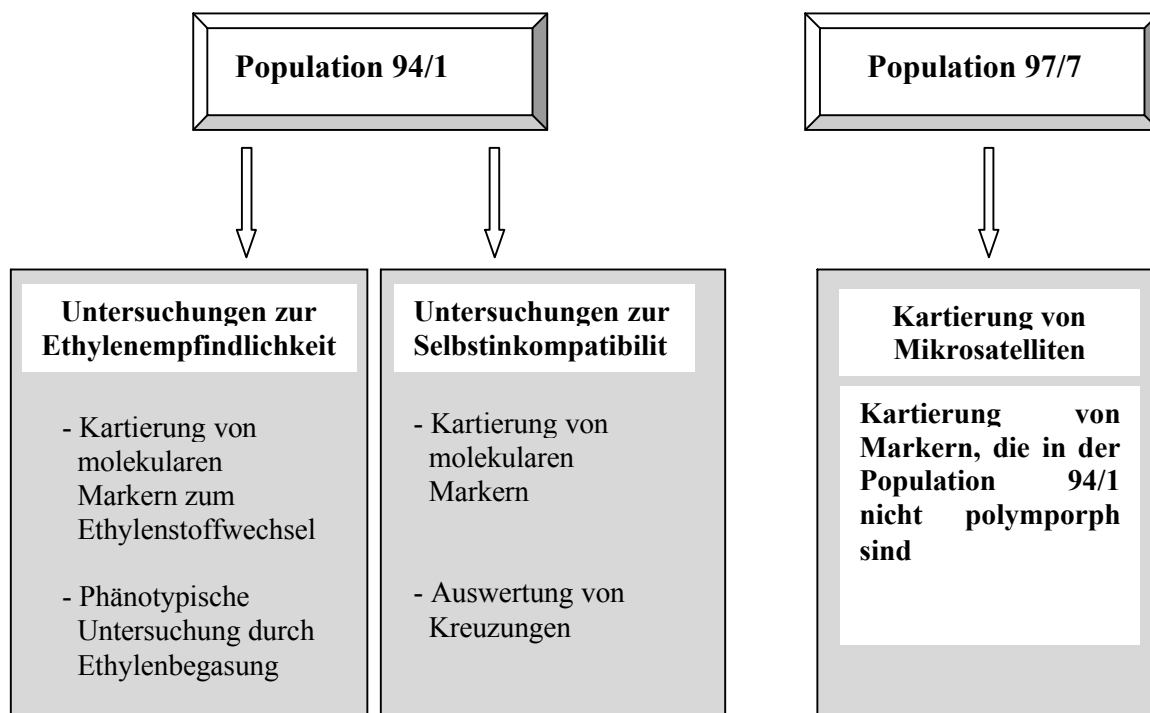


Abb. 13: Schematische Übersicht über die einzelnen Schwerpunkte dieser Arbeit

2. Material

2.1 Pflanzenmaterial

Die für die Kartierung verwendeten diploiden Rosenpopulationen stammen aus dem Institut für Zierpflanzenzüchtung in Ahrensburg und sind seit 2005 Bestandteil der Sammlung des Institutes für Pflanzengenetik der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität in Hannover.

Für die Kartierungen wurden die diploiden Populationen 94/1 mit den Elternpflanzen 93/1-117 (männlicher Elter) und 93/1-119 (weiblicher Elter) und 97/7 eine Rückkreuzung mit den Genotypen 95/13-39 (weiblicher Elter) und 82/78-1 (männlicher Elter) verwendet.

Von den Elternpflanzen werden mehrere Klone im Gewächshaus und Bodenbeeten kultiviert. Die Nachkommen aus den verschiedenen Kreuzungen werden im Gewächshaus, Bodenbeeten und Freiland auf dem Universitätsgelände in Hannover und Ruthe kultiviert.

Die ersten molekularbiologischen Untersuchungen erfolgten stets mit den Elternpflanzen 93/1-117 (Pollenspender) und 93/1-119 (Mutterpflanze) der Population 94/1, die ca. 100 Nachkommen umfaßt. Die Elternpflanzen 93/1-117 und 93/1-119 sind durch offene Bestäubung des diploiden Genotyps 81/42-15 entstandene Halbgeschwister (DEBENER et al., 1999) (*Abb. 14*).

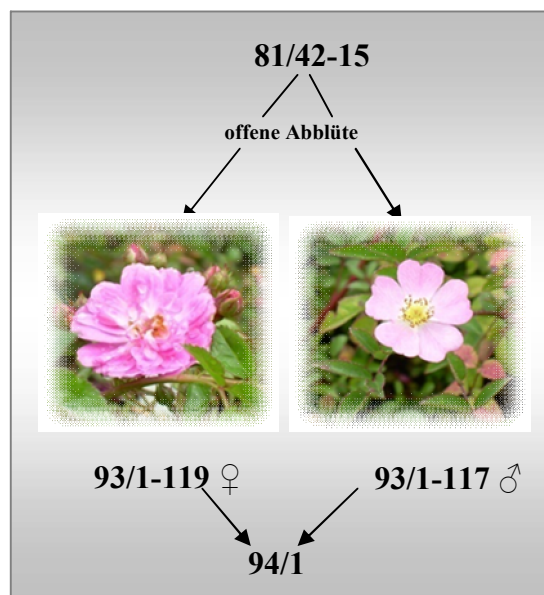


Abb. 14: Kreuzungsschema für die Population 94/1. Die Population 94/1 ist aus einer Kreuzung der Halbgeschwister 93/1-117 und 93/1-119 hervorgegangen, welche wiederum aus offener Abblüte der 81/42-15 entstanden sind.

Die Population 95/18 stellt eine zweite Nachkommenschaft von der 93/1-117 und -119 dar, allerdings ist bei dieser Kreuzung der Genotyp 93/1-117 die Mutterpflanze. Die Nachkommenschaft besteht aus nur 20 Pflanzen, weshalb sie nicht zur Kartierung verwendet wurde. Für die Untersuchung der Vererbung von Si-Allelen stellt sie aber dennoch eine wichtige Kreuzung dar.

Die Kartierungspopulation 97/7 (Abb. 15), besteht aus ca. 170 Genotypen. Sie ist aus einer Kreuzung der Genotypen 88/124-46 (weiblicher Elter) und 82/78-1 (männlicher Elter) gefolgt von einer Rückkreuzung der F1-Hybride 95/13-39 (weiblicher Elter) mit 82/78-1 (männlicher Elter) entstanden.

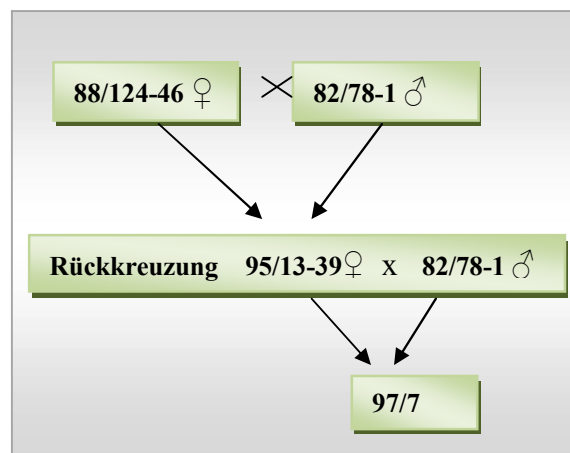


Abb. 15: Kreuzungsschema für die Population 97/7. Die Population 97/7 ist durch eine Rückkreuzung der 95/13-39 mit dem männlichen Elter 82/78-1 entstanden.

Der Genotyp 88/124-46 ist aus einer Kreuzung zwischen einer tetraploiden Gartenrose und einer diploiden *Rosa multiflora*, gefolgt von vier Zyklen offener Bestäubung, hervorgegangen (VON MALEK UND DEBENER, 1998).

Die tetraploide Rosenpopulation der hebräischen Universität in Jerusalem bestehend aus den Eltern *Fragrance Cloud* und *Golden Gate* umfaßt eine Nachkommenschaft von ca. 160 Individuen. Die Eltern, sowie einige Nachkommen wurden in molekularbiologischen Untersuchungen miteinbezogen.

2.2 Sonstige Materialien

Die Feinchemikalien zur Herstellung von Kulturmedien und Pufferlösungen wurden von den Firmen AppliChem, Roth und Sigma-Aldrich bezogen. Bestandteile für die PCR-Reaktionen wurden von den Firmen Invitrogen, Clontech, Fermentas und Roth bestellt. Die Zusammensetzungen der Pufferlösungen, Zusammensetzung der Acrylamidgele, Kits, Primer und sonstige Gebrauchsmaterialien sind im Anhang aufgeführt.

3 Molekularbiologische Methoden

3.1 DNA-Extraktion

Für die DNA-Extraktion wurde junges Blattmaterial zum Abbau von Kohlenhydraten über Nacht bei Raumtemperatur dunkel gelagert. Am nächsten Tag erfolgte die DNA-Extraktion nach einem Protokoll von KOBAYASHI et al. (1998) oder mit dem *Dneasy Plant Mini Kit* von Qiagen.

3.2 RNA-Extraktion

Alle verwendeten Materialien (Eppendorfgeläße, Pipettenspitzen), sowie Aqua dest. wurden zur Vermeidung von RNA-Degradation einer DEPC-Behandlung unterzogen (SAMBROOK UND RUSSELL, 2001).

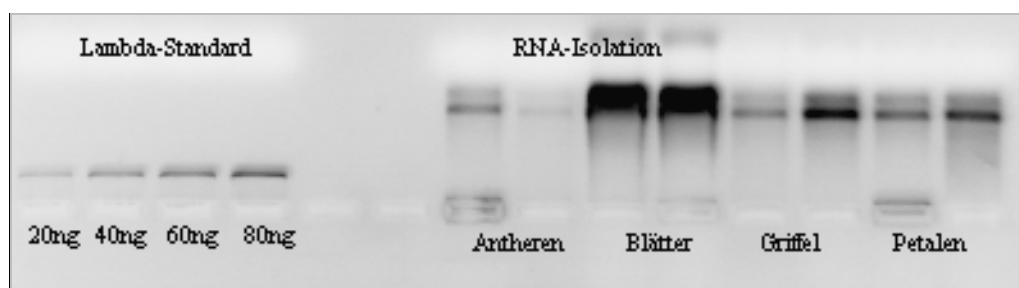


Abb. 16: RNA-Quantifizierung von Antheren, Blättern, Griffeln und Petalen. Links sind verschiedene Konzentrationen von Lambda-DNA aufgetragen. Die Doppelbanden der RNA sind klar von der DNA-Bande in den Geltaschen (bei Antheren und Petalen, jew. erste Probe) zu unterscheiden. In den ersten Ansätzen der Antheren und Petalen-RNA ist noch DNA vorhanden. Die beiden Proben mußten daher erneut einem DNase-Abbau unterzogen werden.

Zur RNA-Isolation wurden 50 mg Blattgewebe, jeweils fünf Griffel, fünf Petalen und/oder ca. zwanzig Antheren pro zu untersuchenden Genotyp verwendet und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Extraktion erfolgte mit dem *Invisorb Spin Plant RNA Mini Kit* von Invitex. Nach erfolgter Extraktion wurde ein DNase-Verdau mit dem Kit *DNA-free* von Ambion, nach entsprechenden Protokoll durchgeführt und die RNA zur Quantifizierung und Kontrolle von Verunreinigungen durch DNA im Agarose-Gel überprüft (*Abb. 16*).

3.3 Aufreinigung und Fällung von Nukleinsäuren

Die Aufreinigung der DNA-Lösungen erfolgte mit Phenol/Chloroform mit anschließender Fällung der Nukleinsäuren mit Isopropanol nach einem Protokoll aus SAMBROOK und RUSSELL (2001)

3.3.1 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Quantifizierung der Nukleinsäuren erfolgte im Agarose-Gel mit einer Lambda-Standardreihe und anschließenden Auswertung mit der Software *Quantity One*. Die Messung der Nukleinsäurekonzentration im Fotometer ergab wesentlich höhere Werte und wurde nicht weiter verwendet, da im Fotometer auch andere Faktoren (Proteine oder sonstige Bestandteile der Lösung) gemessen werden, die vermutlich zu den höheren Werten führten. Unter 3.2 *RNA-Extraktion* ist eine RNA-Quantifizierung dargestellt.

3.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese diente zur Auftrennung von PCR-Produkten und Quantifizierung von Nukleinsäuren. Die Konzentration der Agarose-Gele richtete sich nach der Größe der zu untersuchenden PCR-Produkte. Für PCR-Produkte von einer Größe zwischen 100-2000bp wurde 1,5%, für Produkte unter 100bp und für PCR-Produkte nach enzymatischem Verdau wurden 0,8% und für Quantifizierungen von Nukleinsäuren 1% Agarose (*Peqlab*) in TAE-Puffer mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid verwendet. Die Auftrennung erfolgte in horizontalen Elektrophoresekammern bei einer Spannung von 6-9 V/cm. Als Elektrophoresepuffer diente TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat pH 8,0, 1 mM EDTA) und als Längenstandard wurde eine 1kb-Leiter verwendet. Die Proben wurden mit 0,1 Vol. 10x Ladepuffer (*siehe Anhang*) versetzt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele mittels einem UV-Transilluminator fotografiert und die Bilder gegebenenfalls mit *Adobe Photoshop CS* bearbeitet.

3.6 Polymerase-Kettenreaktionen

3.6.1 PCR-Primer

Eine Übersicht über alle verwendeten Primer befindet sich im Anhang.

a) *Ethylenempfindlichkeit / Ethylenbiosynthese bzw. -erkennung*

Die Primer wurden von Dr. Heiko Mibus-Schoppe, Institut für Zierpflanzen- und Gehölzwissenschaften der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover zur Verfügung gestellt.

b) *Selbstinkompatibilität*

Die Primer wurden teilweise anhand von veröffentlichten Sequenzen verwandter Pflanzen (vor allem *Prunus*) aus der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) und dem Programm Primer3 erstellt oder stammten aus Veröffentlichungen. Sämtliche Primer für den Selbstinkompatibilitätslocus wurden mit Si und fortlaufender Nummer bezeichnet.

c) *TxE Referenzkarte*

Die Primer wurden anhand der Sequenzen aus der T x E- Referenzkarte (Texas x Earlygold) der GDR-Website (Genome Database of Rosaceae, <http://www.bioinfo.wsu.edu/gdr/>) mit Primer3 erstellt. Die ausgesuchten Sequenzen befinden sich auf dem gleichen Chromosom der TxE-Referenzkarte (http://www.bioinfo.wsu.edu/cgi-bin/gdr/cmap/map_set_info?mapset_aid=43) wie der Locus für Selbstinkompatibilität. Es wurden jeweils mehrere Primer für eine Sequenz erstellt und mit TE und fortlaufender Nummer bezeichnet.

3.6.3 PCR-Standardprogramm:

Tab. 2: Standardprogramm für eine Polymerase-Kettenreaktion.

Vorgang	Temperatur und Zeit
Denaturierung	95°C für 4 Min.
40 x Wiederholung des folgenden Zykluses:	
Denaturierung	95°C für 1 Min.
Annealing	55-65°C ca. 1 Min. je nach erwarteter Sequenzlänge
Elongation	72°C für 2 Min.
Finale Elongation (1 x)	72°C für 10 Min.

3.6.4 Gradienten-PCR

Zur Ermittlung der besten Annealingtemperatur für die verwendeten Primer wurde eine Gradienten-PCR mit dem Standardprogramm und einem Temperaturgradienten von 55°C bis 65°C durchgeführt (Abb. 18). Die Annealingtemperatur, die spezifische PCR-Produkte zeigte, wurde für weitere PCRs eingesetzt. In Einzelfällen wurde die Annealingtemperatur auch bis zu 40°C, aber nicht höher als 65°C eingestellt.

3.7 RACE

3.7.1 3'RACE

Da mit einer normalen PCR nur eine Teilsequenz eines Gens amplifiziert wird, wurde für die SFB-Sequenz (Pollenkomponente des Selbstinkompatibilitätssystems) eine 3'RACE (Rapid Amplification of cDNA-Ends) durchgeführt (FROHMAN, 1993).

Im Wesentlichen wurde die 3'RACE nach einem Protokoll von Invitrogen (3'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends) durchgeführt, allerdings wurden die Primer AP und AUAP leicht verändert. Dem AP-Primer wurde an das Poly-T-Ende jeweils eine Base (A/G und C) angehängt, damit der Primer direkt am Sequenzende der Messenger-RNA bindet, denn das Poly-A-Ende kann mehrere hundert Basen enthalten. Außerdem beginnt der Primer mit CCGG. Die letzte Änderung betrifft auch den AUAP-Primer, da dieser an der Adaptor-Sequenz bindet und daher wurde auch der AUAP-Primer entsprechend geändert.

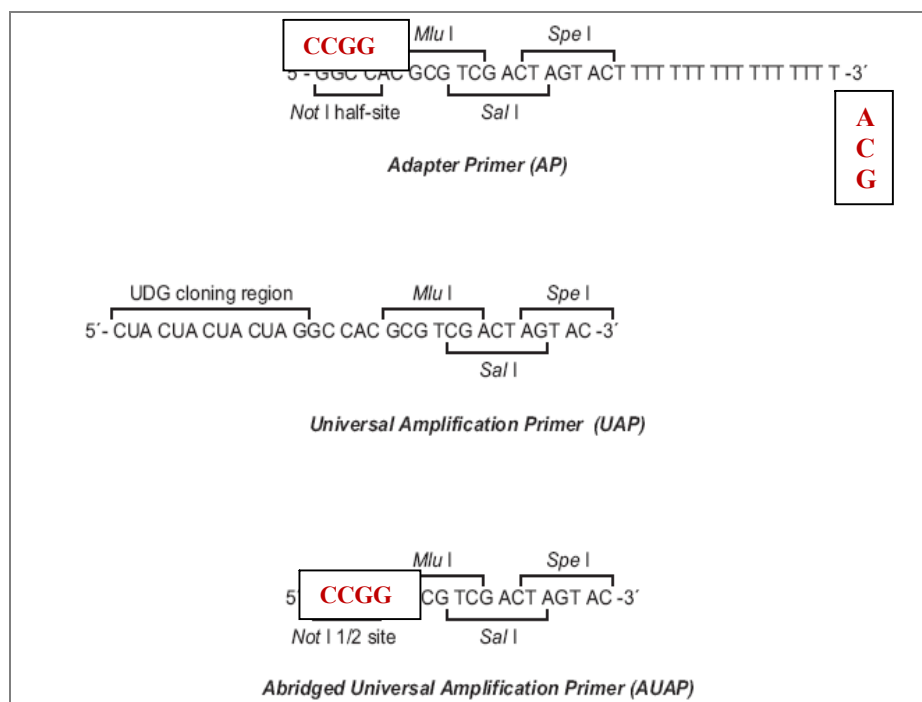


Abb. 17: Primer für 3'RACE mit in rot gekennzeichneten Änderungen. Abbildung aus dem Protokoll 3'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends von Invitrogen (Cat. 18373-019).

Für das 3'-RACE wurde die RNA aus Antheren extrahiert und anschließend mit dem Anker-Primer (AP) eine c-DNA-1.-Strang Synthese mit dem *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* von Applied Biosystems durchgeführt.

Nach der cDNA-Synthese erfolgte ein RNase H-Verdau (2 Einheiten pro Ansatz) bei 37°C für 1h und eine weitere PCR mit einem genspezifischem Primer (GSP) und dem AUAP-Primer. Es wurden drei verschiedene GSPs (Tab. 3) in entsprechend drei verschiedenen Ansätzen nach Herstellerangaben verwendet.

Tab. 3: Sequenzen der GSP-Primer für 3'RACE.

Primer	GSP	Sequenz
Si15	SFB le2	TTGAGCAGGGCTTGGGGTTA
Si15	SFB le4	TCCCTCCAATTTGGGTCCA
Si15	SFB le8	GCCTCATGTCCTTCGATTCAGG

3.7.2 5'RACE

Für die 5'RACE wird zunächst eine cDNA-Synthese durchgeführt. In dieser Arbeit wurde dazu das SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit von Clontech verwendet und entsprechend der Herstellerangaben verfahren. Mit der cDNA wurde dann das RACE mittels genspezifischen Primer (Tab. 4) und einem im Kit vorhandenen Universal-Primer-Mix durchgeführt.

Tab. 4: Sequenzen der GSP-Primer für 5'RACE

Primer	GSP	Sequenz
Si15	5RACE 384	TGGACGGGTTCCATATGATT
Si15	5RACE 348	TCAAAACTTCGTCCGGATTC
Si15	5RACE 251	GCCCTGCTCAAATGTTTCAT

3.8 Genome Walking

Das Genome-Walking ist eine Technik, mit der die Sequenz eines PCR-Produktes verlängert werden kann (KLISTRUP AND KRISTIANSEN, 2000). Hierzu wird genomische DNA mit verschiedenen Restriktionsenzymen (*DraI*, *EcoI*, *Stu* und *Pvu*) geschnitten. An die so entstandenen DNA-Enden werden Adaptern ligiert. Anschließend erfolgt mit jedem Ansatz eine PCR mit einem sequenzspezifischem Primer und einem Primer, der an die Adapter bindet (AP). Nach Analyse auf einem 0,8%igen Agarose-Gel, erfolgt mit den Amplifikaten der ersten PCR, eine Nested-PCR mit einem weiteren sequenzspezifischen Primer. Auf diese Weise wird die Spezifität des PCR-Produktes erhöht.

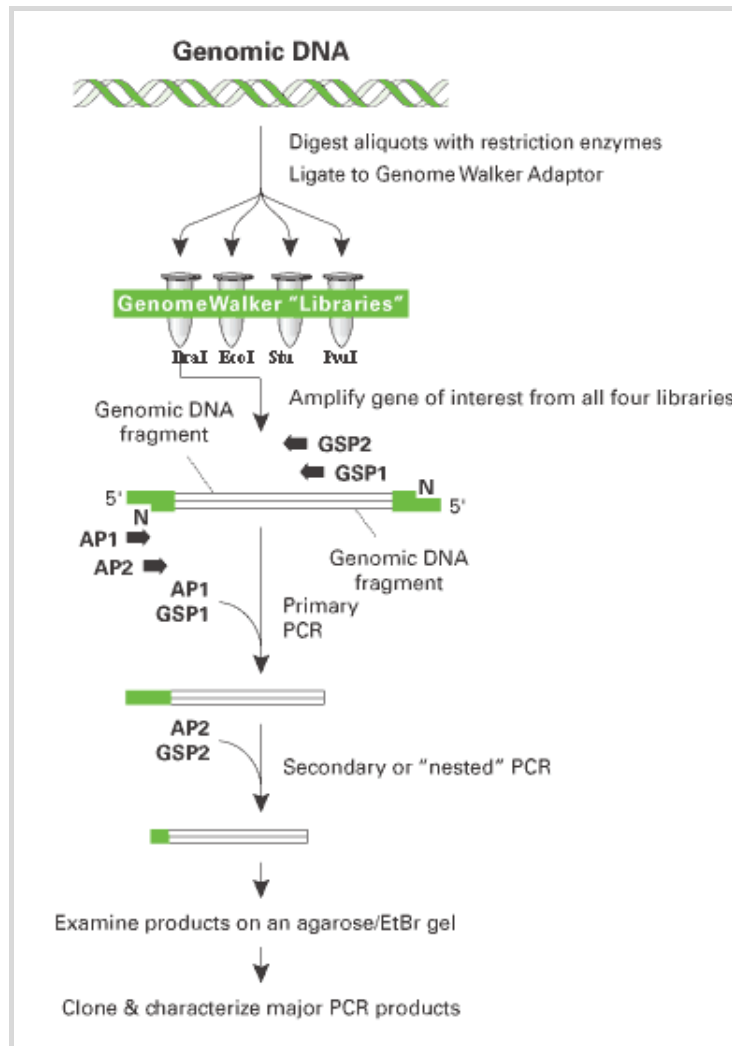


Abb. 18: GenomeWalking aus dem Protokoll von Clontech. AP= Primer, bindet an Adaptersequenz, GSP= Genspezifischer Primer. Nach Restriktionsverdau werden Adapter an die DNA-Fragmente ligiert und eine PCR mit anschließender Nested-PCR durchgeführt.

Für das Genome-Walking wurde das Kit *GenomeWalkerTM Universal Kit* von Clontech verwendet und entsprechend dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

Es wurden drei verschiedene genspezifische Primer erstellt, wobei zwei als GSP 1 und einer als GSP2 diente (Tab. 5).

Tab. 5: GSP-Primer-Sequenzen.

GSP	Bezeichnung	Sequenz
GSP2	Si15 158	GTGGTGGAGGCAGAGTAGATGCATATTT
GSP1	Si15 257	CCCCAAGCCCTGCTCAAATG
GSP1	Si15 339	CGTCCGGATTTCGAAATGCAA

3.9 Eluierung von PCR-Produkten

Für Sequenzuntersuchungen wurden die PCR-Banden aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten, mit dem *MinEluteTM Gel Extraction Kit* von Qiagen nach Herstellerangaben eluiert und sequenziert.

3.10 RT-PCR und Expressionsanalyse

Für die Expressionsanalyse wurde RNA aus Antheren, Griffeln, Blättern und Petalen von Rosen isoliert (siehe 3.2 *RNA-Extraktion*) und in cDNA revers transkribiert. Die reverse Transkription wurde mit dem Kit *Superscript II* von Invitrogen nach Herstellerangaben durchgeführt. Anschließend wurde die Probe mit RNase inkubiert (37°C, 1h) und zur Kontrolle eine Actin-PCR durchgeführt (*Abb. 19*). Nur wenn die Proben eine einzelne Bande zeigten, kleiner als die Bande der genomischen DNA, wurden sie für die Expressionsanalyse verwendet. Die genomische DNA enthält ein Intron in der für Actin kodierenden Region und ist daher anhand ihrer Größe deutlich von der cDNA zu unterscheiden.

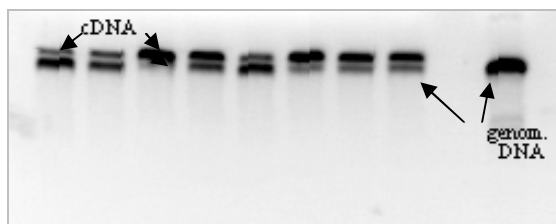


Abb. 19: Actin-Kontrolle. Rechts ist die Kontrolle mit genomischer DNA. Die unterschiedlichen Banden zeigen, dass die Proben sowohl genomische DNA als auch cDNA enthalten. Die unterschiedliche Größe der Actinbande kommt durch ein Intron in der genomischen DNA zustande.

Für die Expressionsanalyse wurde die cDNA in der PCR mit den bereits getesteten Primerpaaren überprüft. Die PCR-Bedingungen waren die gleichen wie zuvor mit genomischer DNA. Nur wenn das Gen in diesem Gewebe exprimiert wurde, kann ein PCR-Produkt amplifiziert und damit eine Genexpression nachgewiesen werden.

3.11 Molekulare Marker

3.11.1 SSCP-Analyse (Single-Strand Conformational Polymorphism)

Für eine SSCP-Analyse (ORITA et al., 1989, HAYASHI 1991) werden DNA-Doppelstränge (PCR-Amplifikate) im SSCP-Ladepuffer (95% Formamid, 0,01M NaOH, 0,05% Xylencyanol, 0,05% Bromphenolblau) durch Erhitzen (95°C/ 5 Min.) denaturiert. Innerhalb der Einzelstränge bilden sich Sekundärstrukturen aus, die in einem nicht-denaturierendem Polyacrylamidgel aufgetrennt werden können. Die verschiedenen Sekundärstrukturen zeigen sich durch Unterschiede im Bandenmuster, die ausgewertet und kartiert werden können.

Die SSCP-Gelelektrophorese (SLABAUGH et al., 1997) wurde wie folgt durchgeführt: Die vordere Glasplatte wurde mit Gelsave (AppliChem) silanisiert, damit sie sich nach der Phorese von der zweiten Glasplatte ablösen läßt. Die hintere Platte wurde mit Bindesilan (15µl Methacryloxypropyltrimethoxysilan + 5 ml Ethanol absolut + 150 µl 10%ige Essigsäure) behandelt, damit das Gel daran haften bleibt. Zwischen die beiden Glasplatten wurde das Polyacrylamidgel (0,5 x MDE Stammlsg., 0,6 x TBE, 5% Glycerin, 2,2 µM APS, 0,06% TEMED) gegossen. Von den mit SSCP-Ladepuffer versetzten Proben wurden 5 µl auf das Gel aufgetragen. Als Laufpuffer wurde 0,6 x TBE (0,1 M Tris, 0,1 M Borsäure, 0,0024 M EDTA, pH 8) verwendet. Die Gele liefen 16h bei 4°C oder Raumtemperatur. Für jeweils ein Primerpaar wurde eine Temperatur für die gesamte Nachkommenschaft beibehalten.

3.11.1.1 Silberfärbung

Die Färbung erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von SANGUINETTI et al. (1994). Nach Entfernen der oberen Glasplatte wurde das Gel für mindestens 1 Stunde in der Fixierlösung inkubiert. Die Fixierlösung wurde anschließend als spätere Stop-Lösung aufgehoben. Das Gel wurde zweimal für 5 Min. in Aqua bidest. gewaschen und im Anschluß 45 Min. in der Färbelösung auf dem Rühr Tisch inkubiert. Nach Abgießen der Färbelösung und kurzem Spülen in Aqua bidest., wurde die kalte Entwicklungslösung zugegeben und mit der Fixierlösung wurde der Färbevorgang gestoppt. Nach zweimaligem waschen des Gels in Aqua bidest. wurde es getrocknet (wahlweise im Trockenschrank oder bei Raumtemperatur) und für die Auswertung auf einem Leuchttisch fotografiert.

Es wurde zwischenzeitlich auch ein Protokoll von GUO et al. (2006) verwendet. Die Inkubationszeiten waren zwar kürzer, aber die Färbung nach SANGUINETTI et al. (1994) erzeugte eine geringere Hintergrundfärbung und damit deutlich besser abgrenzbare Bandenmuster.

3.11.1.2 Die Auswertung der SSCP-Gele

Den Banden der Eltern und der Nachkommenschaft wurden entsprechend ihrer Aufspaltung im SSCP-Gel Allele zugeordnet und in einer Excel-Tabelle erfasst. Anschließend konnte das Spaltungsverhältnis durch Auszählen der einzelnen Häufigkeiten der Genotypen ermittelt werden.

Handelte es sich um komplexere Bandenmuster oder um eine zuvor mit Restriktionsenzymen geschnittene Probe, so wurden den Banden zunächst Nummern in einem System von 1 (vorhanden) und 0 (nicht vorhanden) zugeordnet und das Bandenmuster dominant (=vorhanden) ausgewertet. Dieses wurde ebenfalls in einer Exceltabelle (*Tab. 6*) erfasst und das Spaltungsmuster ermittelt.

Tab. 6: Beispiel für die Auswertung von SSCP-Banden. 1=vorhanden und 0=nicht vorhanden. Für die Bande 1 ergibt sich keine Aufspaltung und daher wurde sie aus der Kartierung ausgeschlossen.



Abb. 20: SSCP-Gel mit PCR-Produkten des Primerpaares RhCTR 2. Es zeigten sich vier Banden zwischen den Eltern, von denen drei in der Nachkommenschaft aufspalten.

Primerpaar	Elter 93/1- 117	Elter 93/1-119	Nachk. 94/1-61	Nachk. 94/1-62	Nachk. 94/1-63 usw.
RhCTR2-1	1	1	1	1	1
RhCTR2-2	1	0	0	1	0
RhCTR2-3	0	1	1	1	1
RhCTR2-4	0	1	1	1	1

In dem zuvor gezeigtem Beispiel (*Abb. 20*) wurde die erste Bande nicht ausgewertet, da sie nicht spaltet. Nachdem das Spaltungsverhältnis errechnet worden ist und die Banden einem dominanten oder kodominanten Erbgang zugeordnet werden konnten, wurde mit dem Programm JoinMap 4.0 (*3.2 Kartierung*) der Locus oder die Loci der Marker im Rosengenom ermittelt.

3.11.2 CAPs (Cleaved amplified polymorphism)

CAPs sind Polymorphismen, die durch unterschiedliches Schneiden von PCR-Produkte durch Restriktionsenzyme entstehen. Eine Untersuchung der Sequenz nach möglichen Schnittstellen bzw. Enzymen erfolgte im Internet unter www.restrictionmapper.org oder mit Hilfe des Programmes Bioedit. Die verwendeten Restriktionsenzyme sind im Anhang aufgelistet.

Die PCR-Produkte bzw. genomische DNA (3.6.6 *Genome Walking*) wurden in dem dazugehörigen Puffer mit dem jeweiligem Restriktionsenzym nach Herstellerangaben inkubiert.

3.11.3 Mikrosatelliten

Der Reaktionsansatz von 15 µl setzte sich wie folgt zusammen: 2,25 mM dNTPs, 23,6 mM MgCl₂, 10 ng DNA, 0,5 Einheit Taq-Polymerase, 1,4 pmol Primer in Taq-Polymerasepuffer.

3.12. Kartierungssoftware

Die Kartierungen in den Populationen 97/7 und 94/1 erfolgte mit dem Programm JoinMap 4.0. Die Kartierung der Mikrosatelliten für die Population 97/7 erfolgte in dem Elter 95/13-39 und dem Großelter Spalier 3. Für die Eltern der Population 94/1 wurden getrennte Datensätze mit den jeweils uniparentalen Markern und biparentalen Markern angelegt. Die Datensätze können bei JoinMap 4.0 direkt als Exceltabelle kopiert werden. Die Kartierung erfolgte für Kopplungen mit eine Rekombinationsfrequenz unter 0.4 und einem LOD größer als 1.00. Die Auswahl der Kopplungsgruppe erfolgte für einen LOD größer als 4.00.

Die QTL-Kartierung in der Population 94/1 erfolgte mit dem Programm MapQTL 6.0. Als Grundlage für die Kartierung dient die mit JoinMap 4.0 erstellte Kopplungskarte, die zusammen mit den QTL-Analysen und dem gesamten Marker-Datensatz nach Erstellung eines neuen Dokumentes geladen werden. Mit dem Daten wurde ein Interval Mapping mit anschließendem Permutationstest durchgeführt. Mit dem Permutationstest wird der Schwellenwert ermittelt, ab denen QTL-Loci gewertet werden können.

Auch nicht kartierte Marker wurden einer QTL-Analyse unterzogen. Sie werden mit dem Programm MapQTL in einer separaten Graphik dargestellt.

3.13 BACs (Bacterial Artificial Chromosome)

Die BAC-Bank wurde aus der *Rosa multiflora* Hybride 88/124-46 durch einen Restriktionsverdau mit HindIII, mit anschließender Ligation in den Vektor pCLD04541 und Transformation in *E. coli* (DH10B) im IZZ in Ahrensburg hergestellt (BIBER et al., 2009 submitted Data). Insgesamt besteht die BAC-Bank aus 59900 Klonen mit einer durchschnittlichen Größe der Inserts von 45,6 kb.

Die Lagerung der BAC-Banken erfolgt in 384 Well Platten in FB-Medium mit Tetracyclin (15 mg/L) bei -80°C.

Für die Herstellung der Filter auf HybondN+ Nylonmembranen (Amersham) im Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung in Köln, wurden 384-Well Platten zweimal übertragen. Die Anordnung der Platten läßt sich anhand eines spezifischen Punktemusters nach Hybridisierung nachvollziehen und dem einzelnen Klon zuordnen.

Nach Zuordnung der 384-Well Platte, läßt sich durch Aufzeichnen ihrer Abgrenzung auf dem Film das entsprechende Well mit dem Signal (Punktemuster) ermitteln und der Klon kann isoliert und vermehrt werden.

3.12.1 Vorbereitung der BAC-Filter

Die Vorbereitung der BAC-Filter erfolgte nach einem Standardprotokoll nach SAMBROCK und RUSSEL (2001).

3.12.2 Hybridisierung

Für die Prähybridisierung wurden die Filter in Glasröhren mit 25 ml Hybridisierungspuffer bei 65°C für 4h inkubiert. Der Hybridisierungspuffer (6 x SSC, 5 x Denhardt's, 0,5% SDS) wurde auf 65°C vorgewärmt, ebenso wie der Hybridisierungsofen. Der Puffer wurde anschließend gewechselt und weitere 4h bei 65°C inkubiert. Für die Hybridisierung wurde der Puffer durch Hybridisierungspuffer mit Sonde ausgetauscht und die Filter für weitere 18h bei 65°C inkubiert. Anschließend wurden die Filter zweimal für 20 Min. bei 65°C mit 0,1 x SSC und 0,1% SDS inkubiert.

Herstellung der radioaktiv markierten Sonde:

Die Sonde bestand aus dem PCR-Produkt des Si15-Primerpaars. 60 ng des PCR-Produktes wurden 5 Min. bei 95°C im Wasserbad denaturiert und anschließend 5 Min. auf Eis gekühlt und abzentrifugiert. Der Reaktionsansatz (auf Eis) bestand aus:

60 ng DNA
2 µl 0,5 mM dNTP (dATP, dTTP, dGTP – KEIN dCTP)
2 µl 10x Hexanucleotidmix (Roche)
5 µl ³²P dCTP (1 µl = 10µCi = 0,36666 MBq)
2 Einheiten Klenow-Enzym
9 µl Aqua dest.

Der Reaktionsansatz wurde 30 Min. bei 37°C inkubiert und nach Zugabe von 80 µl TE auf eine SephadexG50-Säule gegeben und zentrifugiert. Auf diese Weise sollte ungebundenes ³²P dCTP entfernt werden. Der Durchfluß der Säule, der die Sonde enthält, wurde für 5 Min. im Wasserbad bei 95°C denaturiert und anschließend sofort dem Hybridisierungspuffer zugegeben.

3.12.3 Vermehrung und Isolierung der BAC-Klone

Von jeweils drei Einzelkolonien pro Klon wurden in 5 ml LB-Medium mit Tetracyclin (15 mg/L) Kulturen angezogen (KAUFMANN et al., 2003). Am nächsten Tag erfolgte eine Minipräparation der BAC-Klone (3.10.2 *Insert-PCR und Plasmid-Isolation*).

3.12.4 Isolierung von BAC-Enden

Mit den Primern für die BAC-Enden wurde mit allen ausgewählten Klonen eine PCR durchgeführt, um anhand der Amplifikation die Lage der Klone zueinander festzustellen.

3.13 Insert-PCR und Plasmid-Isolation

Für die Insert-PCR wurde eine Mikrotiterplatte vorbereitet. Der Reaktionsansatz von 25 µl setzte sich wie folgt zusammen: 0,25 µM forward und reverse M13-Primer, 0,2 µM dNTPs, 0,5 Einheit Taq-Polymerase in Williamspuffer. Die Bakterien wurden aus der FB-Mikrotiterplatte mit einem Bakterienstempel überführt. Die PCR-Reaktionsbedingungen im Thermocycler werden in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tab. 7: Programm für Insert-PCR

Vorgang	Temperatur und Zeit
Denaturierung	95°C für 2 Min.
30 x Wiederholung:	
Denaturierung	94°C für 45 Sek.
Annealing	52°C für 45 Sek.
Elongation	72°C für 2 Min. 30 Sek.
Finale Elongation (1 x)	72°C für 10 Min.

Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von SAMBROOK UND RUSSELL (2001). Die Bakterien wurden in 5 ml Ampicillin-haltigen LB-Medium bei 37°C für 16h auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension bei 10000 Upm bei 4°C pelletiert und in 200 µl Lösung 1 resuspendiert und fünf Minuten auf Eis inkubiert. Zur Lyse der Bakterien wurden 400 µl der Lösung 2 zugegeben und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 300 µl der Lösung 3 zugegeben und für 20 Min. auf Eis inkubiert. Nach diesem Schritt erfolgt die Präzipitierung der Zellbestandteile und Bakterien-DNA. Es folgte eine Phenol/Chloroform Extraktion zur Aufreinigung der DNA. Die Plasmid-DNA im wässrigen Überstand wurde mit Isopropanol gefällt, mit 70%igen Ethanol gewaschen und nach Trocknung in TE-Puffer resuspendiert. Nach der Inkubation mit RNase A (10 µg/ml) bei 37°C für 1h, wurde die DNA mit Chloroform extrahiert, mit 100%igem Ethanol gefällt und in Aqua dest. aufgenommen.

3.14 Sequenzierung

Für die Sequenzierungsreaktionen wurde das Kit *Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit* von Amersham Biosciences verwendet. Durch die Verwendung von unterschiedlich IRD-markierten M13-Primer (IRD 700 und 800) lassen sich forward- und reverse-Sequenzen voneinander unterscheiden. Die Reaktionsansätze mit einem Volumen von 13 µl setzten sich wie folgt zusammen: 300 ng Plasmid-DNA, 23% (v/v) DMSO, 0,15 µM forward und reverse Primer. Von diesen Ansätzen wurden je 2 µl zu 2 µl der vom Hersteller mitgelieferten A-/C-/G-/T-Reaktionslösungen gegeben, die außer dem entsprechenden Desoxynukleotid auch Taq-DNA-Polymerase enthielten.

Die PCR-Bedingungen für die Sequenzierung sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tab. 8: PCR-Programm für Sequenzierungen

Vorgang	Temperatur und Zeit
Denaturierung	95°C für 5 Min.
30 x Wiederholung:	
Denaturierung	95°C für 30 Sek.
Annealing	56°C für 30 Sek.
Elongation	70°C für 30 Sek.
Finale Elongation (1 x)	70°C für 10 Min.

Zum Beenden der Sequenzierungsreaktion wurde 1 Vol. Formamid-haltige Stopplösung zum Reaktionsansatz gegeben und für 2 Min. bei 70°C inkubiert. Anschließend wurden die PCR-Produkte in einem 6%igen denaturierendem Polyacrylamidgel mit einem Doppellaser-Sequenzsystem aufgetrennt. Die Daten wurden mit der Software *Baseimage IR* aufgezeichnet und anschließend mit den Programmen *DNASIS* (Version 2.1.) und *Bioedit* weiterbearbeitet. Dabei wurden die Vektorsequenzen entfernt und die Sequenzen miteinander verglichen.

Die Sequenzierung erfolgte auch außer Haus. Dazu wurden entweder PCR-Produkte nach Eluierung aus dem Agarose-Gel zu *AGOWA*, *MWG* oder *Seqlab* gesendet oder aber zunächst in den *pGEM-T Easy*-Vektor ligiert, transformiert und kloniert, um die isolierte Plasmid-DNA einzusenden.

Die BAC-Klon-Enden wurden von der Firma GATC sequenziert.

3.15 Phänotypische Untersuchungen zur Ethylenempfindlichkeit

Die Untersuchungen zur Haltbarkeit wurden im Institut für Zierpflanzen- und Gehölzwissenschaften der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover mit freundlicher Unterstützung von Dr. Heiko Mibus durchgeführt.

Für die Untersuchungen zur Haltbarkeit wurde der Abwurf der Fiederblätter unter Begasung mit dem Phytohormon Ethylen untersucht. Pro Versuchseinheit wurden jeweils fünf Blätter je Genotyp aus dem oberen Drittel der Pflanze mit einer Rasierklinge abgetrennt und in einer offenen feuchten Kammer in einem geschlossenen 200 Liter Aquarium mit Ethylen inkubiert (*Abb.27*). Um andere Stressfaktoren gering zu halten, wurde eine Zeitschaltuhr auf jeweils 12stündige Belichtung eingestellt. Die Blätter sollten bei dieser Versuchsanordnung weder Stress durch Austrocknung (feuchte Kammern) noch durch Dunkelheit ausgesetzt sein. Die

Versuchsdauer belief sich jeweils auf sechs Tage. Das Ethylen wurde mit einer Pumpe in das Aquarium geleitet und die während des Versuchsverlaufs regelmäßig kontrollierte Konzentration betrug $1,5 \text{ ppm} \pm 0,3 \text{ ppm}$.

Durch einen Vorversuch wurde ermittelt, ab wann die Blätter ihre Fiederblätter abwerfen, da dies als Kriterium für die Ethylenempfindlichkeit herangezogen werden sollte. Vor dem dritten Tag fand kein Abwurf statt. Aus diesem Grund wurde erst ab dem dritten Tag der Abwurf der Fiederblätter protokolliert. Da die Fiederblätter aufgrund der feuchten Unterlage nicht sichtbar abfallen können, wurde leicht gegen die Kammern geklopft. In einer Exceltabelle wurde der Abwurf der Fiederblätter von den fünf Blättern erfaßt. Es wurden ca. 80 Genotypen untersucht und die Versuchsreihen wurden dreimal wiederholt.

Für die Berechnungen wurden die Werte der einzelnen Versuchstage pro Genotyp gemittelt, um sie später in die QTL-Analyse einbeziehen zu können. Außerdem wurde auch eine Häufigkeitsverteilung durchgeführt, um einen Verlauf der Blattabwurf-Reaktion auf Ethylen verfolgen zu können.



Abb. 21: Ethylenbegasung. Jeweils fünf Blätter pro Genotyp wurden in einer offenen feuchten Kammer in einem geschlossenen 200 Liter Aquarium mit Ethylen ($1,5 \text{ ppm} \pm 0,3 \text{ ppm}$) für 6 Tage inkubiert.

3.16 Verwendete Software

Tab. 9: *Programme und Webseiten*

Programm	
Biodit	http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit/
BLAST	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
CLUSTAL X	ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/CLUSTALX/
GDR	Genome Database of Rosaceae http://www.bioinfo.wsu.edu/gdr/
JoinMap 4.0 MapQTL	PRI (Plant Research International/ Wageningen (NL))
Restrictionmapper	www.restrictionmapper.org
Primer3	http://frodo.wi.mit.edu/

4. Ergebnisse

4.1. Ethylenempfindlichkeit von Rosenblättern

4.1.1 Phänotypische Untersuchungen zur Ethylenempfindlichkeit

Die phänotypischen Untersuchungen zur Ethylenempfindlichkeit von Rosen wurden an einzelnen Nachkommen der Population 94/1 durchgeführt. Für die Untersuchung wurde der Abwurf der Fiederblätter bei $1,5 \text{ ppm} \pm 0,3 \text{ ppm}$ Ethylenbegasung in einem Zeitraum von sechs Tagen untersucht.

Die Analyse der Reaktion von Rosenblättern auf das Phytohormon durch die Begasung von einzelnen Blättern anstelle einer Begasung der einzelnen Genotypen in Klimakammern ermöglichte eine dreifache Versuchswiederholung mit jeweils fünf Blättern pro Genotyp.

Die Elternpflanzen 93/1-117 und -119 zeigen hinsichtlich der Haltbarkeit von Blüten und Blätter deutliche Unterschiede, die in der Nachkommenschaft aufspalten. Die meisten Individuen der Population bilden je Blatt sieben Fiederblätter aus, aber auch jede Anzahl zwischen fünf und neun wurde beobachtet. Für die Untersuchungen der Ethylenempfindlichkeit wurden meistens Blätter mit sieben Fiederblätter gewählt, da sie am häufigsten ausgebildet wurden und der Unterschied bei einem Vergleich zwischen den Individuen mit gleicher Anzahl an Fiederblättern deutlicher erkennbar wird.

Die Protokollierung des Blattabwurfs wurde ab dem dritten Tag begonnen, da sich in Vorversuchen vor dem dritten Tag nur eine sehr geringe Reaktion auf das Phytohormon Ethylen gezeigt hat.

Die Untersuchungen der Population 94/1 zur Ethylenempfindlichkeit haben ab dem dritten Tag der Begasung Unterschiede im Blattfall gezeigt. Einige Individuen der Nachkommenschaft reagieren entsprechend transgressiver Segregation resistenter oder auch empfindlicher als die Elternpflanzen auf die Begasung mit Ethylen.

In der nachfolgenden Abbildung ist der Blattbestand der Elternpflanzen ab dem dritten Tag dargestellt. Da die Versuchsreihen mit den Individuen der Population 94/1 in zwei Aquarien durchgeführt wurden, wurden von den Kreuzungseltern insgesamt doppelt so viele Beobachtungen erfaßt. Die Datensätze wurden getrennt bearbeitet und beide sind in der Abbildung 22 dargestellt.

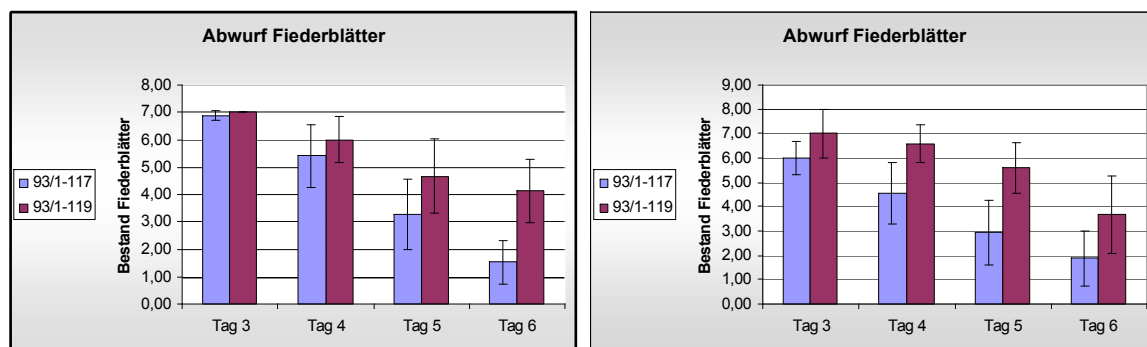


Abb. 22: Blattbestand der Elternpflanzen in Prozent im Verlauf der Ethylenbegasung von 6 Tagen. Die Begasungsversuche fanden in zwei Aquarien statt und die Elternpflanzen wurden jeweils in beiden Aquarien in drei Ansätzen aufgenommen. Daher wurden von den Elternpflanzen doppelt so viele Individuen untersucht. Die Auswertung der beiden Versuchsdurchführungen mit jeweils drei Ansätze wurden getrennt ausgewertet und sind oben beide als Diagramm mit Standardabweichung dargestellt.

Der Unterschied im Blattabwurf zwischen den beiden Eltern 93/1-117 und -119 ist ab dem fünften Tag signifikant und verstärkt sich am sechsten Tag. Der Genotyp 93/1-117 reagiert empfindlicher auf das Phytohormon Ethylen als der Genotyp 93/1-119.

Die Elternpflanze 93/1-117 zeigt einen stärkeren Blattverlust als die Elternpflanze 93/1-119. Die Standardabweichung bezieht sich sowohl auf die fünf Blätter pro Versuchsansatz als auch auf die dreimalige Versuchswiederholung. Zur Überprüfung der Signifikanz der Ergebnisse wurde ein Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Der Test ergab einen signifikanten Unterschied zwischen den Testergebnissen der Eltern am 6. Tag für den ersten Datensatz und für den 3. und 5. Tag für den zweiten Datensatz.

Die Unterschiede im Blattabwurf in der Population 94/1 zeigten sich in den darauffolgenden Tagen deutlicher und werden anhand von Häufigkeitsverteilungen in der nachfolgenden Abbildung (Abb. 23) zum Vergleich dargestellt.

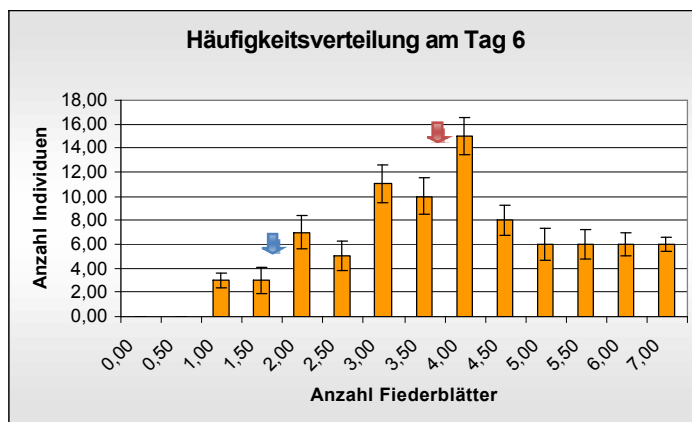
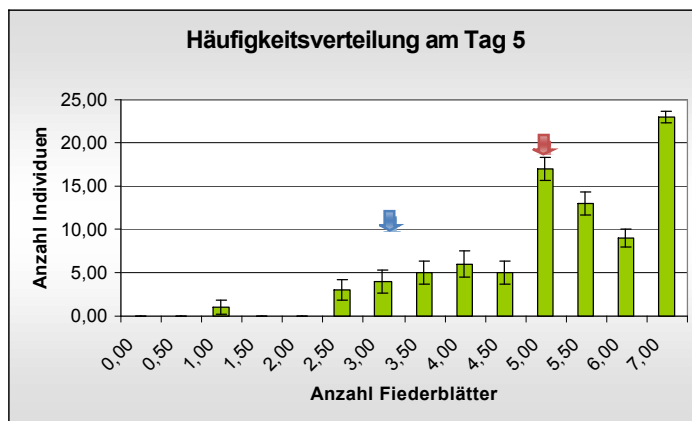
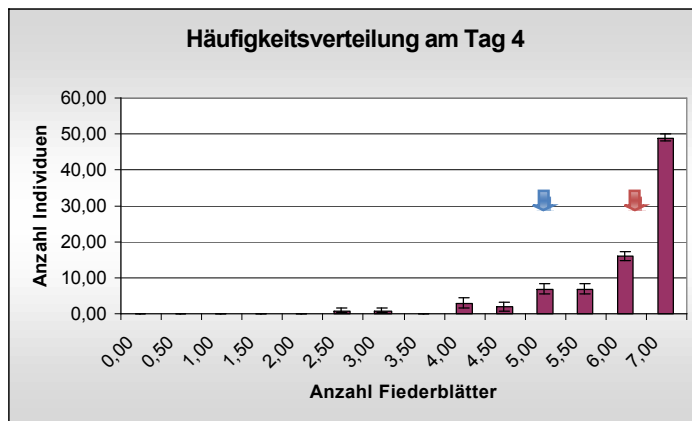
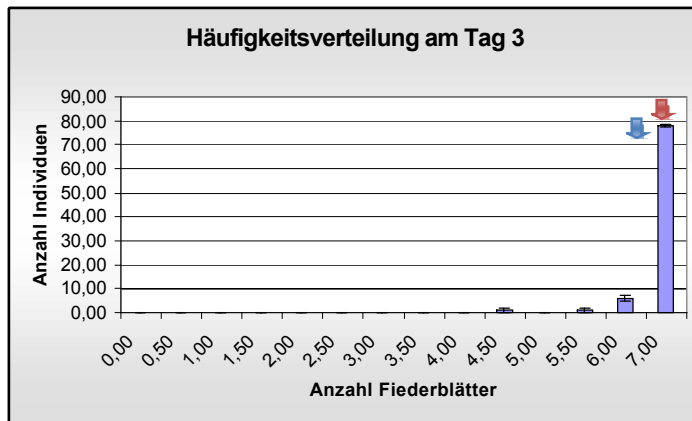


Abb. 23: Häufigkeitsverteilung des Blattbestandes der Population 94/1 nach Ethylenbegasung. Auf der Y-Achse ist die Anzahl der Genotypen dargestellt, auf der x-Achse ist die Anzahl an Fiederblättern gezeigt. Der blaue Pfeil zeigt den Wert des Genotyps 93/1-117 und der rote Pfeil den Blattbestand des Genotyps 93/1-119.

Am dritten Tag ist der Blattabwurf noch sehr gering und die meisten Individuen besitzen noch sieben Fiederblätter. Nach fünf und sechs Tagen zeigt sich die Reaktion auf das Phytohormon Ethylen deutlicher und die Häufigkeit von vier Fiederblätter ist nach sechs Tagen mit 15 Individuen am größten. Lediglich sechs von 82 untersuchten Individuen zeigten nach sechs Tagen noch keinen Blattabwurf.

Die Häufigkeitsverteilungen des Blattbestandes der Population 94/1 während der Ethylenbegasung zeigt einen stetig steigenden Blattabwurf. Am Tag sechs gleicht die Häufigkeitsverteilung annähernd einer Normalverteilung.

4.1.2 Kartierung von Strukturgenen zum Ethylenstoffwechsel

Die phänotypische Untersuchung zur Ethylenempfindlichkeit hat deutliche Unterschiede in der Population 94/1 ergeben. Aus diesem Grund soll mit der Kartierung von Strukturgenen zum Ethylenstoffwechsel eine Grundlage für weitere Untersuchungen zur Ethylensensitivität geschaffen werden. Es wurden Primer für Strukturgene aus dem Bereich der Ethylenerkennung (ETR), der Ethylenantwort (CTR und Transkriptionsfaktoren), sowie der Ethylenbiosynthese (ACS) auf Amplifikation untersucht (Tab. 10).

Tab. 10: Übersicht der Primer zur Ethylenempfindlichkeit von Rosen und ihrer Amplifikation in der Population 94/1, 97/7 und den tetraploiden Elternpflanzen einer israelischen Nachkommenschaft, *Fragrance Cloud* (FC) und *Golden Gate* (GG). Die Fragmentgrößen beziehen sich auf genomische DNA, in Klammern ist die Größe der cDNA angegeben.

Primer	Genotypen	Annealing Temperatur	Amplifikation	Fragmentgrößen R. hybrida	Fragmentgrößen 93/1-117 bzw. -119
RhACS 1	Pop. 94/1 Pop. 97/7 FC/GG	56°C	ja ja ja	205 bp	920 bp
RhACS 2	Pop. 94/1 Pop. 97/7 FC/GG	55°C	ja ja ja	369 (249)	350 bp
RhACS 3	Pop. 94/1 Pop. 97/7 FC/GG	56°C	ja ja ja	126	544 bp
RhACS 4	Pop. 94/1 Pop. 97/7 FC/GG	55°C	ja schwach ja	237	180 bp
RhACS 5	Pop. 94/1 Pop. 97/7 FC/GG	56°C	ja ja ja	345 (248)	302 bp
RhCTR 1	Pop. 94/1 Pop. 97/7 FC/GG	50°C	ja schwach schwach	706	1190 bp
RhCTR 2	Pop. 94/1 Pop. 97/7 FC/GG	55°C	ja ja ja	357	830 (110) bp
RhETR 1	Pop. 94/1 Pop. 97/7 FC/GG	55°C	ja ja ja	522 (393)	471 bp
RhETR 2	Pop. 94/1 Pop. 97/7 FC/GG	56°C	ja ja ja	978 (213)	870 bp
RhETR 3	Pop. 94/1 Pop. 97/7 FC/GG	56°C	ja ja ja	661	661 bp
RhETR 4	Pop. 94/1 Pop. 97/7 FC/GG	55°C	ja ja ja	500	600 bp
RhEil	Pop. 94/1 Pop. 97/7 FC/GG	56°C	Ja Nein Nein	64	540 bp
RhEIN3	Pop. 94/1 Pop. 97/7 FC/GG	55°C	schwach Nein Nein	192	210 bp
RhERF	Pop. 94/1 Pop. 97/7 FC/GG	56°C	schwach Nein Nein	236	320 bp

In der Tabelle 10 sind alle Primer für Strukturgene des Ethylenstoffwechsels und ihre Amplifikationsprodukte in *Rosa hybrida* und den Eltern 93/1-117 und -119 der zu untersuchenden Population 94/1 dargestellt. Außer in der Population 94/1 wurde ihre Amplifikation auch in der Population 97/7 und den tetraploiden Elternpflanzen einer israelischen Rosennachkommenschaft, *Fragrance Cloud* (FC) und *Golden Gate* (GG) untersucht. Letzteres erfolgte als Voruntersuchung für eine Kartierung der Ethylenstrukturgene in einer Rosenkarte von *Fragrance Cloud* und *Golden Gate* an der Hebräischen Universität Jerusalem.

Die PCR-Produkte der in der Tabelle 10 aufgelisteten Primer zeigten zwischen den Elternpflanzen 93/1-117 und 93/1-119 im Agarose-Gel keinen Größenunterschied und wurden daher auf SSCP-Gelen aufgetrennt. Die nachfolgende Abbildung zeigt ein Beispiel einer SSCP-Analyse.

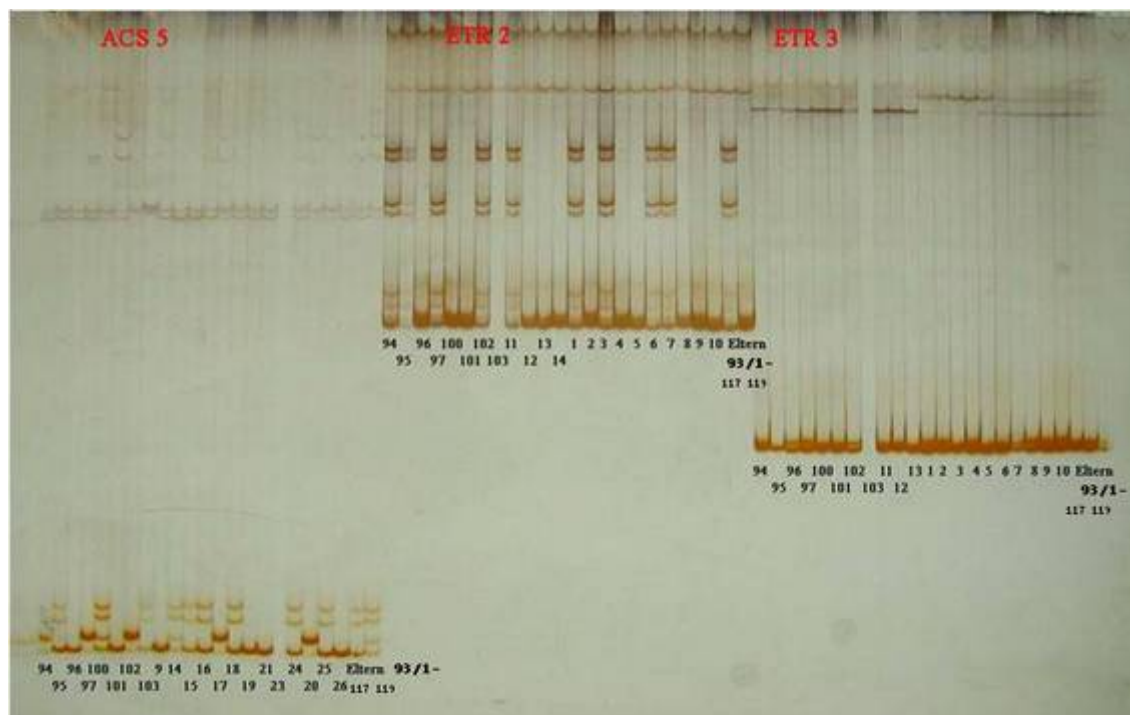


Abb. 24: SSCP-Gel mit PCR-Produkten der Primer *RhACS5*, *RhETR2* und *RhETR3* von einigen Individuen der Pop. 94/1. Im Gegensatz zum Agarose-Gel sind im SSCP-Gel deutliche Polymorphismen in Form unterschiedlicher Bandenmuster erkennbar.

Einige Amplifikationen zeigten auch im SSCP-Gel keine Polymorphismen in der Nachkommenschaft. Diese wurden mit Restriktionsenzymen inkubiert und anschließend erneut im Agarose-Gel und ggf. im SSCP-Gel auf Polymorphismen untersucht. Die Tabelle 11 zeigt eine Übersicht über die Ergebnisse der SSCP-Analyse.

Tab. 11: Ergebnisse der SSCP-Analyse. Die Transkriptionsfaktoren (RhEil, RhEIN3) und RhETR1 zeigten keinen Polymorphismus. Das Primerpaar RhERF ergab kein Amplifikat.

Primer	Polymorphismus im SSCP-Gel	Polymorphismus im SSCP- oder Agarose-Gel nach enzym. Verdau	Anzahl Loci 93/1-117	Anzahl Loci 93/1-119
RhACS 1	Ja	--	3	2
RhACS 2	Nein	Ja (Mse)	1	1
RhACS 3	Ja	--	3	3
RhACS 4	Nein	Ja (Mbo)	2	1
RhACS 5	Ja	--	2	2
RhCTR 1	Nein	Ja (Mbo)	3	3
RhCTR 2	Ja	--	3	3
RhETR 1	Nein	--	2	2
RhETR 2	Ja	--	3	2
RhETR 3	Ja	--	2	2
RhETR 4	Nein	Ja (Taq)	2	2
RhEil	Nein	--	--	--
RhEIN3	Nein	--	--	--
RhERF	Nein	--	--	--

Die Amplifikate der Primerpaare (Tab. 10) wurden sequenziert und anschließend in der NCBI-Datenbank auf ihre Zugehörigkeit überprüft. Die Tabelle 12a zeigt die Ergebnisse der Sequenzanalyse.

Tab. 12a: Ergebnisse der Sequenzanalyse zur Untersuchung der Ethylenempfindlichkeit. Die Variabilität zwischen den Sequenzen eines Genotyps sind für das Primerpaar RhACS1 sehr hoch. Es könnten zwei Allele oder aber eine unspezifische Amplifikation sein.

Primer	Genotyp 93/1	Anzahl Sequenzierung	Variabilität zwischen Sequenzen vom gleichen Genotyp	Übereinstimmung zwischen den Genotypen
RhACS 1	-117	2	49%	25%***
	-119	2	45%	
RhACS 2	-117	2	18%	60%
	-119	2	7%	
RhACS 3	-117	3	9%	82%
	-119	2	keine	
RhACS 4	-119	4	14%	--
RhACS 5	-117	2	7%	77%
	-119	4	2 Allele, 11%	
RhCTR 1	-117	2	11,40%	58,82%
	-119	2	20,83%	
RhCTR 2	-117	3	nur eine Sequenz ausgew.	--
RhETR 1	-117	2	9%	54%
	-119	2	5%	
RhETR 2	-119	3	nur eine Sequenz ausgew.	--
RhETR 3	-119	3	nur eine Sequenz ausgew.	--
RhETR 4	-119	2	23%	--
RhEIN3	-119	2	nur eine Sequenz ausgew.	--

*** wegen hoher Variabilität nur eine Sequenz pro Genotyp ausgewertet

Tab. 12b: Ergebnisse der Sequenzanalyse zur Untersuchung der Ethylenempfindlichkeit. Mit den ausgewählten Primerpaaren wurde die Sequenz des entsprechenden Gens amplifiziert.

Primer	Genotyp 93/1	Übereinstimmung zu <i>R. hybrida</i>	Acc. No.	Blast Value
RhACS 1	-117 -119	zu variable Sequenzen	gi 20372647 gb AY061946	5e-61
RhACS 2	-117 -119	62% 75%	gi 42495328 gb AY525066	4e-46
RhACS 3	-117 -119	86% 84%	gi 42495330 gb AY525067	5e-116
RhACS 4	-119	76%	gi 42495332 gb AY525068	8e-21
RhACS 5	-117 -119	69% 67%	gi 42495334 gb AY525069	6e-24
RhCTR 1	-117 -119	98,44% ohne Introns	gi 13936370 gb AY032953	--
RhCTR 2	-117	ohne Intron 100%	gi 13603390 gb AY029067	1e-13
RhETR 1	-117 -119	54% 88%	gi 63145983 gb AY953869	2e-77
RhETR 2	-119	97%	gi 4416485 gb AF127220	8e-150
RhETR 3	-119	99%	gi 5020363 gb AF154119	2e-150
RhETR 4	-119	72% der ersten 160bp	gi 5566246 gb AAD45346.1 AF159172	3e-52
RhEIN3	-119	94%	gi 20378358 gb AF443783	5e-34

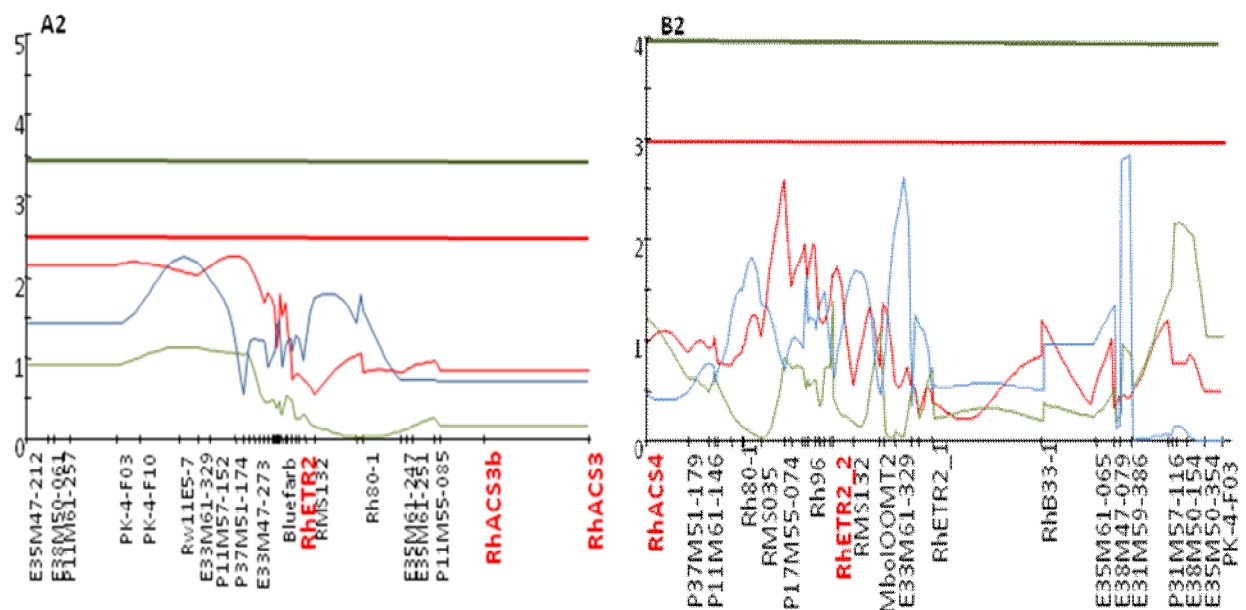
Alle amplifizierten Sequenzen stimmen mit den dazugehörigen Gensequenzen von *Rosa hybrida* überein. Die Sequenzen des Primerpaares RhETR1 für den Genotyp 93/1-117 zeigen mit 54% wenig Übereinstimmung zur *R. hybrida* Sequenz, ergaben aber bei BLAST Untersuchungen in NCBI Übereinstimmungen zu ETR-Sequenzen. Zudem ist die Übereinstimmung zum Genotyp 93/1-119 mit 54% auch sehr gering. Die RhETR1-Sequenz vom Genotyp 93/1-119 weist mit 88% eine deutlich höhere Übereinstimmung zu *R. hybrida* auf. Die Primer RhCTR1_1 und RhACS3 wurden kodominant ausgewertet und ihr Spaltungsverhältnis entspricht 1:2:1. Alle anderen Primerpaare wurden dominant ausgewertet und zeigten eine 1:1 Spaltung.

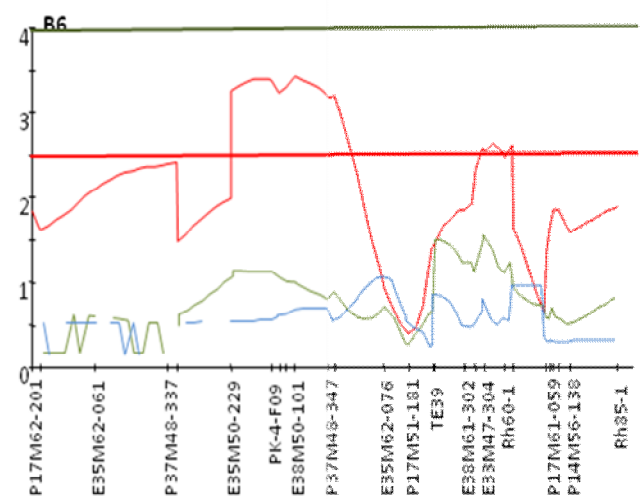
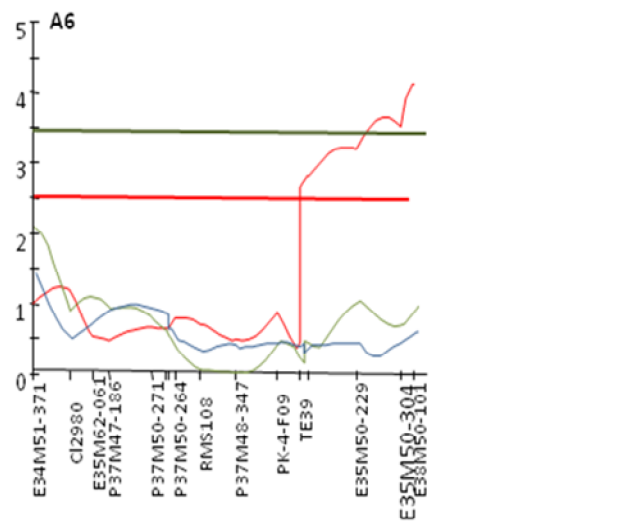
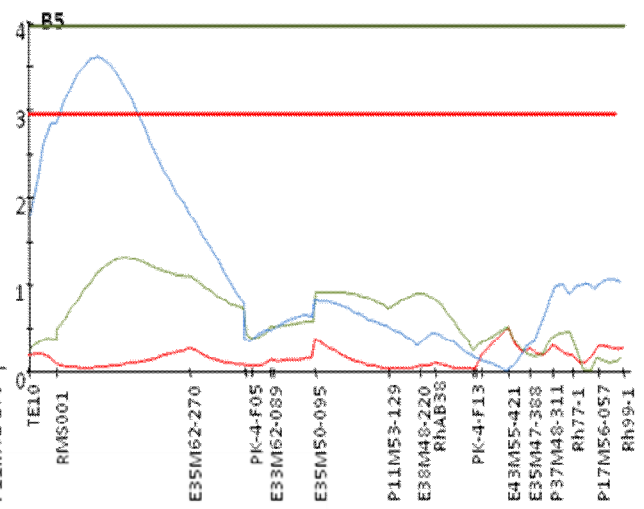
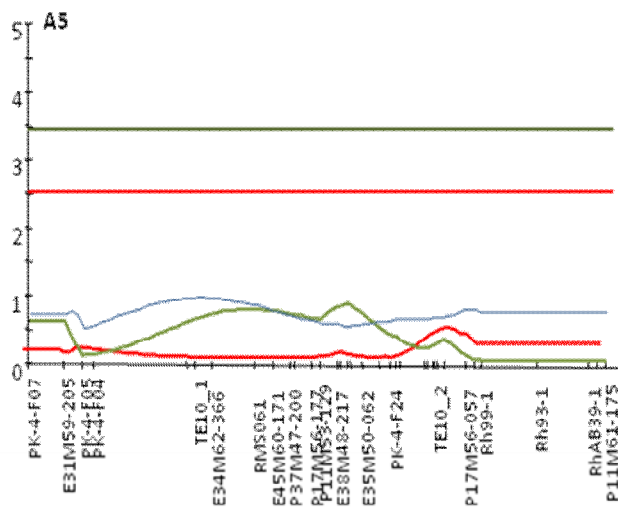
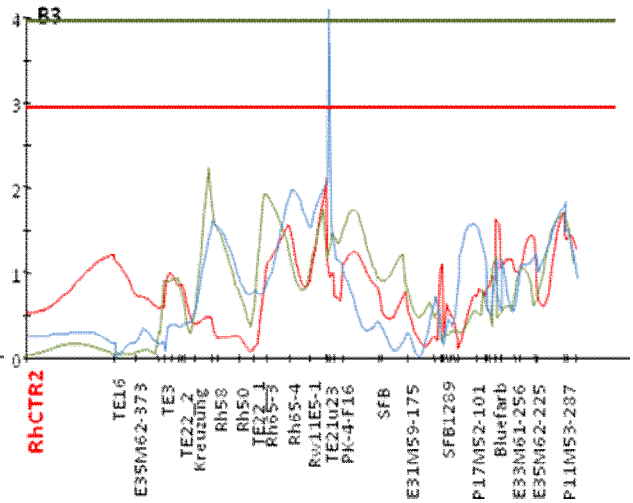
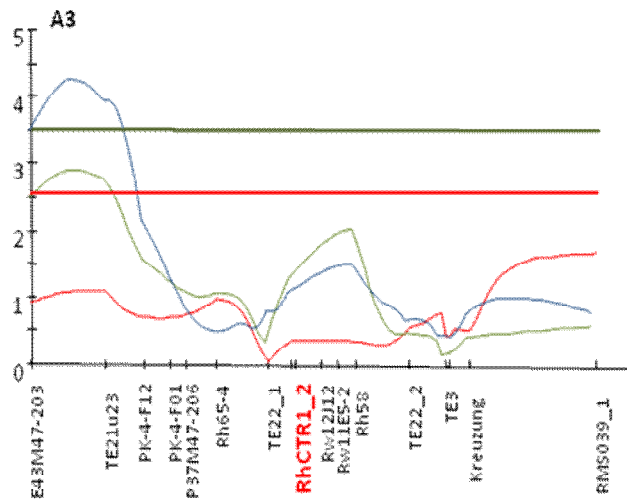
Für zehn Primerpaare konnten insgesamt 16 Strukturgene zur Ethylenempfindlichkeit in den Elternpflanzen 93/1-117 und 93/1-119 kartiert werden (siehe 4.3 Rosenkopplungskarte der Population 94/I).

4.1.3 QTL-Analyse

Die QTL-Kartierung der phänotypischen Untersuchungen zur Ethylenempfindlichkeit erfolgte in einer Genkarte der Population 94/1 mit 520 molekulare Marker und einer Gesamtlänge von 545cM (Yan et al., 2005). Zur Ermittlung der Loci wurde ein Interval Mapping mit anschließendem Permutationstest durchgeführt. Durch den Permutationstest sollte der Schwellenwert ermittelt werden, ab dem ein Signal gewertet werden kann.

Für die QTL-Kartierung wurden die Analysen des Blattabwurfs nach 4, 5 und 6 Tagen Ethylenbegasung einbezogen und in der nachfolgenden Darstellung in verschiedenen Farben gekennzeichnet. **Tag 4** ist in rot, **Tag 5** in grün und **Tag 6** in blau dargestellt. Die eingezeichnete rote Linie stellt das Ergebnis des Permutationstests für die jeweilige Kopplungsgruppe dar. Die grüne Linie stellt das Ergebnis des Permutationstests für das gesamte Genom dar.





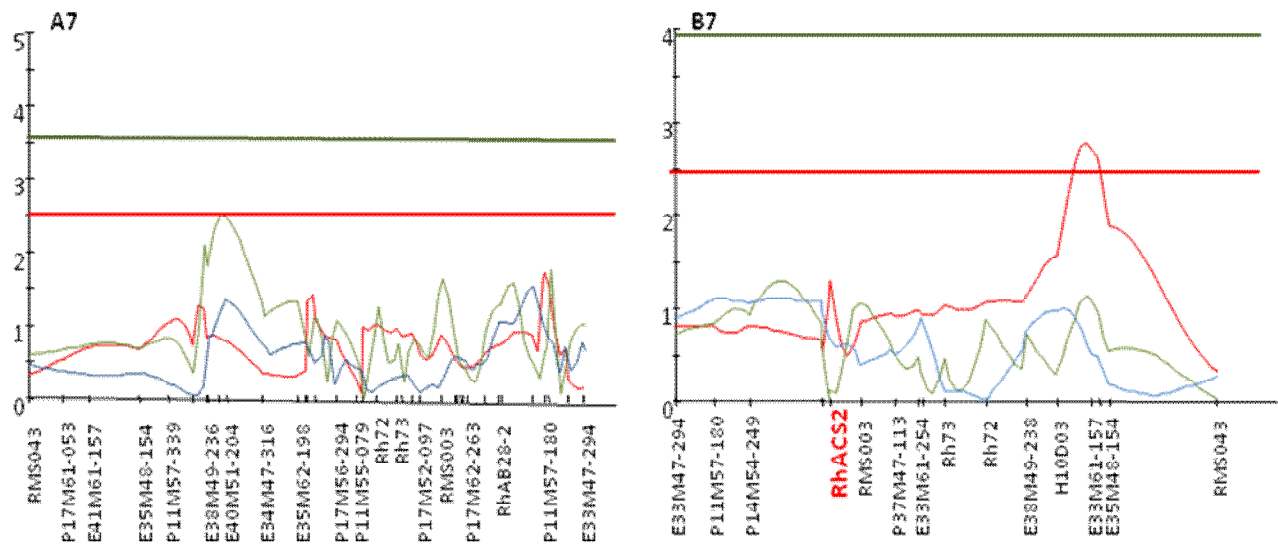


Abb. 25: Ergebnisse der QTL-Analyse der phänotypischen Untersuchung zur Ethylenempfindlichkeit. Die einzelnen Kopplungsgruppen (ermittelt mit JoinMap 4.0) sind mit A für den Genotyp 93/1-117 bzw. B für den Genotyp 93/1-119 bezeichnet. Für das Interval Mapping wurde der Blattabwurf nach Tag 4 (rot), 5 (grün) und 6 (blau) mit Ethylenbegasung einbezogen. Die roten Linien sind das Ergebnis des Permutationstest für die jeweilige Kopplungsgruppe, die grüne Linie ist das Permutationsergebnis für das gesamte Genom.

Der Genotyp 93/1-119 zeigte sich in der phänotypischen Untersuchung zur Ethylenempfindlichkeit als unempfindlicher als der Genotyp 93/1-117. Die Kopplungsgruppen eins, zwei und vier zeigen bei beiden Eltern keinen QTL für Ethylenempfindlichkeit. Ein QTL für Tag 6 nach Ethylenbegasung ist für beide Genotypen auf der Kopplungsgruppe drei vorhanden. Für die Kopplungsgruppe 5 ist nur für den Genotyp 93/1-119 nach Tag 6 ein QTL vorhanden. Für Tag 5 ist kein QTL-Signal vorhanden. Die QTLs für Tag 4 sind auf den Kopplungsgruppen sechs für beide Genotypen und sieben für den Genotyp 93/1-119 lokalisiert.

Der Genotyp 93/1-119 zeigte sich in der phänotypischen Untersuchung zur Ethylenempfindlichkeit als unempfindlicher als der Genotyp 93/1-117.

Die QTL-Kartierung ergab für die phänotypischen Daten von vier Tagen Ethylenbegasung Loci auf den Kopplungsgruppen sechs mit einem LOD von 3,5 für den Genotyp 93/1-119 und einem $\text{LOD} > 4$ für den Genotyp 93/1-117 und Kopplungsgruppe sieben mit einem LOD von 2,8 für den Genotyp 93/1-119. Die Signale korrelieren mit keinen kartierten Strukturgenen zum Ethylenstoffwechsel. Für den Genotyp 93/1-119 konnte ein Signal bei RhACS2 auf der Kopplungsgruppe sieben ermittelt werden. Das Signal liegt mit einem LOD von 1,4 unter dem Schwellenwert, aber höher als der übrige Verlauf der QTL-Kurve mit Ausnahme des oben genannten Signals mit einem LOD von 2,8.

Nach fünf Tagen Ethylenbegasung zeigten sich für beide Genotypen keine QTL-Signale.

Es wurden QTL-Signale mit einem $\text{LOD} > 4$ nach sechs Tagen Ethylenbegasung für beide Genotypen auf der Kopplungsgruppe drei ermittelt und mit einem LOD-Wert von 3,6 auf der Kopplungsgruppe fünf für den Genotyp 93/1-119.

Es wurde kein QTL-Signal ermittelt, welches unmittelbar mit einem kartierten Strukturgen lokalisiert werden konnte. Bei dem Strukturgen RhCTR2 (Genotyp 93/1-117) zeigt sich ein

Anstieg der QTL-Kurve, allerdings erreicht sie nicht den Schwellenwert. Bei dem Strukturgen RhETR2 zeigt sich vor allem beim Genotyp 93/1-117 ein Einbruch der QTL-Kurve.

Die Kopplungsgruppen eins, zwei und vier zeigen bei beiden Eltern keinen QTL für Ethylenempfindlichkeit.

Die QTL-Daten wurden mittels MapQTL einem Kruskal-Wallis-Test unterzogen, um sie auf Gleichheit bzw. Ungleichheit zur Verteilung zu überprüfen und so ein zufälliges QTL-Signal auszuschließen. Das ermittelte Kruskal-Wallis Ergebnis für die QTL-Signale entspricht der Nullhypothese, womit es sich um nicht zufällige QTL-Signale handelt.

4.2. Selbstinkompatibilität

Das Vorhandensein eines Selbstinkompatibilitätssystems ist für einige Mitglieder der Familie Rosaceae bereits belegt (*1.3.2 Gametophytische Selbstinkompatibilität*). Erste Hinweise auf ein Selbstinkompatibilitätssystem in den Nachkommenschaften der Kreuzungseltern 93/1-119 und 93/1-117 zeigen sich durch die Aufspaltung der Blütenfüllung. In der Kreuzung 93/1-119 x 93/1-117 spaltet die Nachkommenschaft 1:1 (Population 94/1) für gefüllte und ungefüllte Blüten. Anders als erwartet spaltet die Nachkommenschaft der Kreuzung 93/1-117 x 93/1-119 nicht 1:1 für das Merkmal Blütenfüllung (*Abb. 26*), sondern zeigt zu 90% gefüllte Blüten (Populationen 95/18 und 99/16). Dieses Phänomen läßt sich durch Allelausschluß wie es bei der gametophytischen Selbstinkompatibilität vorkommt, erklären.

♀ 117 ♂			♀ 119 ♂			Kreuzungen	Spaltung
f	f		F	f			
F	F f	F f	f	F f	f f	119 x 117 Ff x ff Pop. 94/1	1:1
f	f f	f f	f	F f	f f	117 x 119 ff x Ff Pop. 95/18 u. 99/16	1:1

Abb. 26: Punnett-Squares für die Vererbung der Blütenfüllung (f = ungefüllt, F = gefüllt). Der Elter 93/1-117 zeigt ungefüllte Blüten, der Elter 93/1-119 gefüllte Blüten. Links ist die Kreuzung 93/1-119 x 93/1-117 und rechts die reziproke Kreuzung 93/1-117 x 93/1-119 dargestellt. Beide Kreuzungen sollten zu Nachkommenschaften mit einer 1:1 Spaltung für das Merkmal Blütenfüllung führen.

Die unterschiedliche Aufspaltung des Merkmals Blütenfüllung in den Nachkommenschaften der Eltern 93/1-117 und -119 hat nicht nur den ersten Hinweis auf ein gametophytisches Selbstinkompatibilitätssystem ergeben, sondern ermöglichte auch durch die Kartierung des

Merkmals in der Population 94/1 (YAN ET AL., 2005) einen Anhaltspunkt auf welcher Kopplungsgruppe sich die Si-Allele im Rosengenom befinden.

Zur Untersuchung der Selbstinkompatibilität bei Rosen wurden sowohl Kreuzungsversuche als auch molekularbiologische Untersuchungen durchgeführt. Zunächst soll mit den Kreuzungsdaten begonnen werden, anschließend wird mit den molekularbiologischen Untersuchungen fortgefahren und in dem Kapitel Kartierung (4.3 *Kartierung*) werden alle kartierten Strukturgene (auch zur Ethylenempfindlichkeit) zusammengefaßt.

4.2.1 Kreuzungsdaten

Mit verschiedenen Kreuzungen sollte die Allelaufteilung der Elternpflanzen 93/1-117 und -119 und ihrer Nachkommenschaft 94/1 für den Si-Locus ermittelt werden. Zunächst wurde dafür durch theoretische Kreuzungen die Anzahl an unterschiedlichen Allelen geschätzt.

Es sind bei gametophytischer Selbstinkompatibilität von diploiden Elternpflanzen nicht mehr als vier verschiedene Allele zu erwarten. Im Falle von vier verschiedenen Allelen findet kein Allelausschluß statt und eine Kreuzung zwischen den Halbgeschwistern 93/1-117 und 93/1-119 wäre in jedem Fall erfolgreich. Im nachfolgenden Punnett-Square wird die Allelaufteilung in der Nachkommenschaft dargestellt.

♀ 119	♂ 117		
		C	D
AB A		A C	A D
AB B		B C	B D

Abb. 27: Punnett-Square für die Elternpflanzen 93/1-117 und -119 im theoretischen Fall von vier verschiedenen Si-Allelen.

In diesem Falle werden alle Si-Allele an die Nachkommenschaft vererbt. Es findet kein Allelausschluß statt und die Kreuzung 93/1-119 x 93/1-117, sowie die reziproke Kreuzung 93/1-117 x 93/1-119 führen zu Nachkommenschaften mit derselben Allelverteilung.

Sind die Allele der Kreuzungseltern identisch, ist keine erfolgreiche Kreuzung möglich, da jeweils jedes Allel des Kreuzungseltern 93/1-117 von der Mutterpflanze 93/1-119 ausgeschlossen wird. Hier sei darauf hingewiesen, dass die Kreuzungseltern für den Si-Locus, aufgrund des gametophytischen Selbstinkompatibilitätssystem nicht homozygot sein können, da erfolgreiche Kreuzungsnachkommenschaften (Population 94/1, 95/18 und 99/16) existieren.

Existieren insgesamt drei verschiedene Allele, besitzen die Kreuzungseltern demnach ein Allel gemeinsam und eines welches sich vom anderen Elter unterscheidet, dann ist eine Kreuzung möglich. Die Abbildung 28 zeigt die Vererbung der Allele an die Nachkommenschaft.

♀ 119	♂ 117	A	C
AB A	--	AC	
AB B	--	BC	

Abb. 28: Punnett-Square für die Elternpflanzen 93/1-117 und -119 im theoretischen Fall von drei verschiedenen Si-Allelen.

In diesem Fall wird durch das Selbstinkompatibilitätssystem das Allel A vom Elter 93/1-117 ausgeschlossen, da es mit der Mutterpflanze 93/1-119 identisch ist. In der Nachkommenschaft 94/1 können aus diesem Grund nur die Allelkombinationen AC und AB vorkommen und bei reziproker Kreuzung (nicht dargestellt) werden nur die Allele AB und CB an die Nachkommen weitervererbt.

Ein Selbstinkompatibilitätssystem mit drei verschiedenen Si-Allelen bei den Elternpflanzen 93/1-117 und -119 würde die Allelkombinationen AC und BC in der Nachkommenschaft 94/1 ergeben und auch die Merkmalsbeobachtung zur Blütenfüllung (4.2 *Selbstinkompatibilität*) kann durch den Allelausschluß erklärt werden, denn in der reziproken Kreuzung werden die Allele AB und CB vererbt. Damit unterscheiden sich die Nachkommenschaften der beiden Kreuzungen in ihrer Allelaufteilung. Liegt das Merkmal für die Blütenfüllung in der Nähe des Si-Locus, so ist auch dieses Merkmal von dem Allelausschluß betroffen.

Weitere Kreuzungsuntersuchungen bestätigen die „drei-Si-Allel-Hypothese“. Im Falle von vier verschiedenen Allelen müßten sich alle Nachkommen mit den Eltern kreuzen lassen, da immer ein Allel von den Allelen der Mutterpflanze verschieden ist.

Im Falle von drei Allelen kann jeder Nachkomme mit der Mutterpflanze gekreuzt werden, aber Nachkommen mit der Allelkombination AC sollten keinen Ansatz nach der Bestäubung mit der Elternpflanze 93/1-117 zeigen (Abb. 29). Um diese Hypothese zu bestätigen wurden Rückkreuzungen vorgenommen.

♀ 117 ♂ Nachkommen	A	C
AC A	--	--
AC C	--	--

♀ 117 ♂ Nachkommen	A	C
BC B	AB	--
BC C	AC	--

♀ 119 ♂ Nachkommen	A	B
AC A	--	AB
AC C	--	BC

♀ 119 ♂ Nachkommen	A	B
BC B	AB	--
BC C	AC	--

Abb. 29: *Punnett-Squares für Rückkreuzungen von Individuen aus der Population 94/1 mit den Eltern 93/1-117 und -119 bei insgesamt drei verschiedenen Si-Allelen.*

Alle Nachkommen lassen sich mit der Mutterpflanze 93/1-119 kreuzen (untere Punnett-Squares), aber der Genotyp AC sollte keinen Ansatz nach Bestäubung mit der Elternpflanze 93/1-117 zeigen.

Die Rückkreuzungen dienten auch entsprechend der drei-Si-Allel-Hypothese dazu, die Genotypen der Nachkommen zu ermitteln, denn nur bei Nachkommen mit den Allelen BC kann eine Kreuzung mit dem Elter 93/1-117 zum Fruchtansatz führen. Die Rückkreuzung mit dem Elter 93/1-119 führt zu keinem Ergebnis hinsichtlich der Genotypen der Nachkommenschaft, da eine Bestäubung immer zum Fruchtansatz führen sollte, diente sie zur Kontrolle.

Die Rückkreuzungen der Nachkommen mit dem Elter 93/1-119 führten bei 67 Nachkommen zu 67 Fruchtansätzen.

Die Rückkreuzungen der Nachkommen mit dem Elter 93/1-117 führten bei 67 Nachkommen zu 36 Fruchtansätzen.

Die Rückkreuzungen bestätigen die drei-Allel-Hypothese, da sich die Nachkommen alle mit dem Elter 93/1-119, aber nur ca. die Hälfte mit dem Elter 93/1-117 kreuzen lassen und es konnte auf diese Weise die Allelkombination von 67 Nachkommen ermittelt werden (Tab. 13).

Tab. 13: Verteilung der Allelkombinationen von 55 Individuen der Nachkommenschaft 94/1. Einige Nachkommen der Population 94/1 wurden mit den Eltern gekreuzt. Die Bestäubung mit Pollen des Elter 93/1-119 führt immer zum Fruchtansatz. Die Rückkreuzung mit dem Elter 93/1-117 dient zur Ermittlung der Genotypen der Nachkommenschaft, da nur die Nachkommen mit den Allelen BC zu einem Fruchtansatz führen.

Allelkombination der Nachkommen	93/1-117	93/1-119
bc	Fruchtansatz, 36 Kreuzungen	Fruchtansatz
ac	kein Fruchtansatz, 31 Kreuzungen	Fruchtansatz

Für die Kartierung wurden entsprechend dem Punnett-Square den Nachkommen die Allele AC (kein Ansatz) und BC (Ansatz) für Rückkreuzung mit dem Elter 93/1-117 zugeordnet. Nachfolgend wird ein Ausschnitt von der Kopplungsgruppe drei des Elters 93/1-119 gezeigt, auf welcher die Kartierung der Rückkreuzungsdaten erfolgt ist. Die Merkmale Selbstinkompatibilität und Blütenfüllung zeigen 20 Rekombinante innerhalb der Nachkommenschaft. Beide Merkmale liegen auf derselben Kopplungsgruppe.

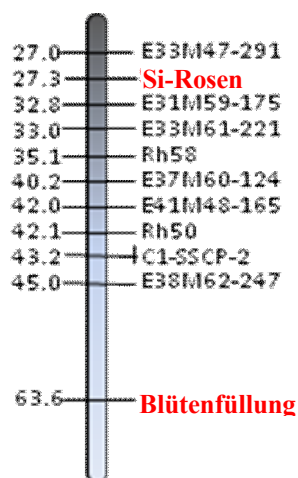


Abb. 30: Ausschnitt aus der Kopplungsgruppe drei des Elters 93/1-119. Sowohl die Kartierung der Rückkreuzungsdaten als auch des Merkmals Blütenfüllung erfolgte auf der Kopplungsgruppe drei. Die vollständige Kopplungskarte wird unter 4.3 Rosenkopplungskarte der Population 94/1 gezeigt.

4.2.2 Molekularbiologische Untersuchung des Si-Locus in Rosen

Der Si-Locus im Genom der Rosenpopulation 94/1 wird durch die Kartierung der Rückkreuzungsdaten auf der Kopplungsgruppe drei vermutet. In weitere Untersuchungen soll der Si-Locus genauer bestimmt werden. Zunächst sollte aufgrund der bestehenden Syntänie innerhalb der Rosaceae (und anderen Pflanzenfamilien) die Texas x Earlygold- Referenzkarte für die Ermittlung des Si-Locus herangezogen werden.

4.2.2.1 Texas x Earlygold Referenzkarte

Der Si-Locus in *Prunus* ist bereits schon näher untersucht und auch kartiert worden. Aufgrund der zu vermutenden Syntänie zwischen *Prunus* und *Rosa* konnte eine Kopplungskarte von *Prunus* als Anhaltspunkt für die Lage bestimmter Gene im Genom dienen. Aus diesem Grund wurde für die Untersuchung des Si-Locus in Rosen die *Prunus*-Referenzkarte (http://www.bioinfo.wsu.edu/cgi-bin/gdr/cmap/map_set_info?mapset_aid=43) herangezogen.

In der *Prunus*-Referenzkarte ist der Si-Locus auf der Kopplungsgruppe sechs dargestellt. Da die Si-Sequenzen sehr polymorph sind, wurden für EST-Sequenzen, die keine Rekombination zum Si-Locus zeigen, mit Hilfe des Programms Primer3 (siehe 3.6.1 Primer) Primerpaare erstellt.

Zwei der erstellten Primer, TE3 und TE4 ergaben Amplifikate in *Rosa* und zeigten im SSCP-Gel Polymorphismen in den Nachkommenschaften Population 94/1 und 97/7, sowie 95/18 und auch zwischen den tetraploiden Elternpflanzen *Fragrance Cloud* und *Golden Gate* einer israelischen Rosenpopulation. Die PCR-Produkte wurden sequenziert und mit den TxE-Originalsequenzen (PP_LEa0010K05f und PP_LEa0013F14f) verglichen. Die Rosen-TE3- und TE4- Sequenzen zeigten eine hohe Übereinstimmung (Abb. 31) zu den Originalsequenzen der *Prunus*-Referenzkarte und wiesen zusätzlich noch zwei Introns auf.

Nachfolgend ist ein Alignment von TE3 (Genotyp 93/1-117) mit der Originalsequenz PP_LEa0010K05f dargestellt (Abb. 31).

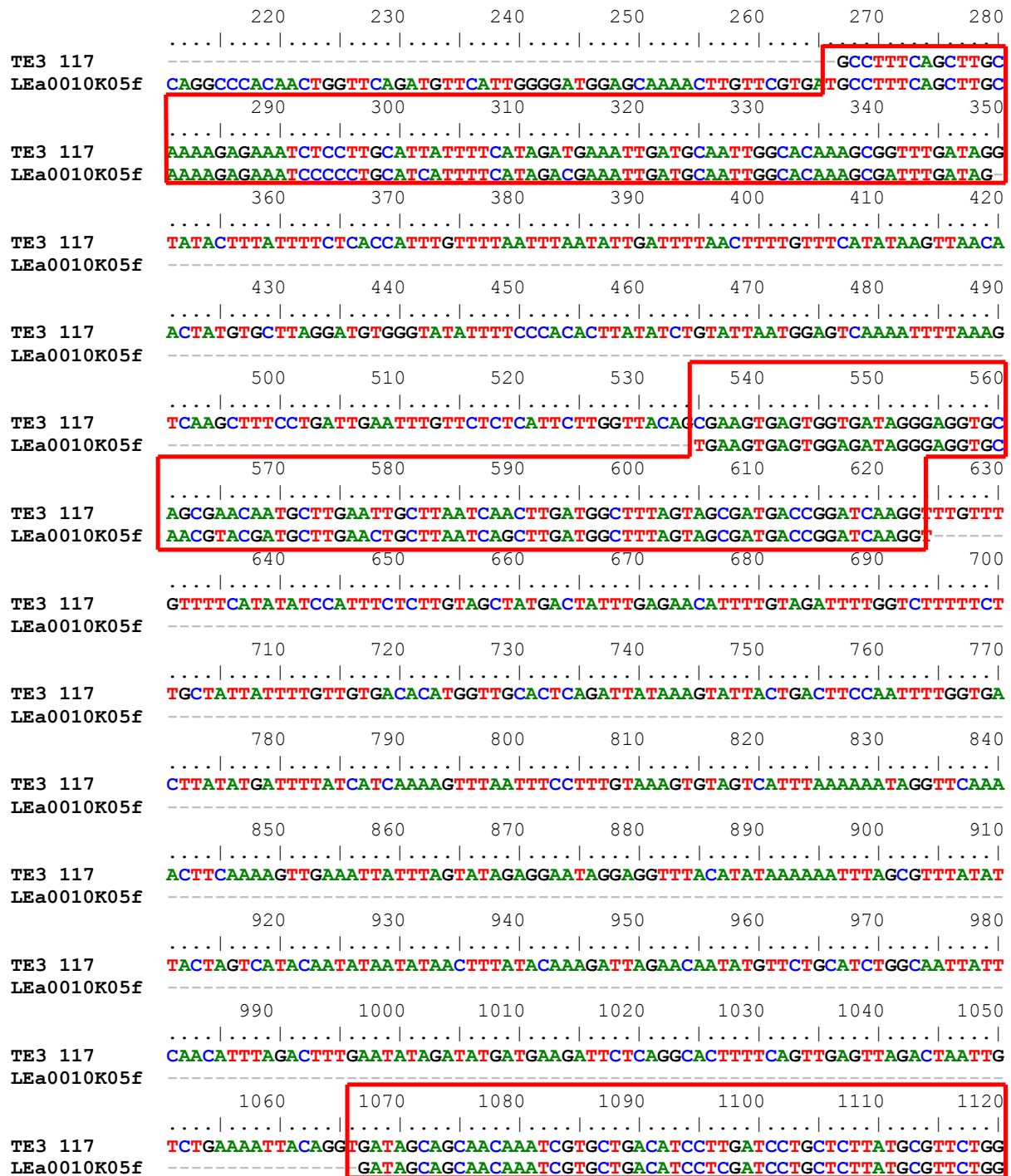


Abb. 31: Alignment von der TE3-Sequenz vom Kreuzungselter 93/1-117 mit der *Prunus*-Referenzsequenz (http://www.bioinfo.wsu.edu/cgi-bin/gdr/cmap/map_set_info?mapset_aid=43). Die TE3-Sequenz von Rosen zeigt zwei Introns, die übrige Sequenz (rote Umrandung) stimmt zu 98% mit der LEa0010K05f-Sequenz überein.

Die BLAST-Untersuchung mit den ermittelten TE3- und TE4-Sequenzen in Rosen ergab ebenso wie die TxE- Originalsequenz in der NCBI-Datenbank keine Übereinstimmung zu Sequenzen mit bekannter Funktion.

Die weitere Analyse der TE3 und TE4 PCR-Produkte von den Populationen 94/1 und 97/7, sowie 95/18 erfolgte im SSCP-Gel, da sie im Agarose-Gel keine Polymorphismen gezeigt haben. Die Aufspaltung in der Nachkommenschaft 94/1 sollte in der Nähe des Si-Locus eine Besonderheit durch den Allelausschluß aufweisen, die um so deutlicher wird, wenn sie der reziproken Kreuzungspopulation 95/18 (93/1-117 x 93/1-119) gegenübergestellt wird, da die unterschiedliche Allelverteilung in den beiden Nachkommenschaften auch zu einem unterschiedlichen Bandenmuster führen sollte. Aus diesem Grund wurde für die Analyse der TE3 und TE4 PCR-Produkte auch die Population 95/18 herangezogen, obgleich die Anzahl ihrer Individuen nicht für eine Kopplungskarte ausreicht. Nachfolgend wird das Ergebnis der Untersuchung für TE4 dargestellt.

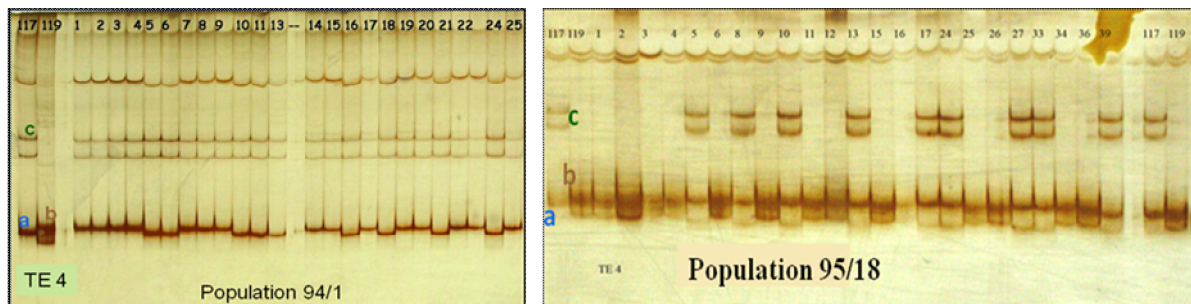


Abb. 32: SSCP-Analyse der TE4 PCR-Produkte. Normalerweise sollte die Aufspaltung in der Nachkommenschaft bei gleichen Elternpflanzen identisch sein, unabhängig davon welche Pflanze als Pollenspender oder Mutterpflanze eingesetzt wurde. In diesem Fall wurden Allele ausgeschlossen und das führt zu unterschiedlichen Bandenmustern in der Nachkommenschaft. Die Einteilung der Allele wird unter 4.2.1 Kreuzungsdaten erklärt.

Die SSCP-Analysen zeigen sowohl für TE3 als auch für TE4 PCR-Produkten in den Nachkommenschaften 94/1 und 95/18 dieselben Bandenmuster mit unterschiedlicher Aufspaltung. In der Population 94/1 spaltet das c-Allel des Elters 93/1-117 nicht in der Nachkommenschaft auf. In der reziproken Kreuzung spaltet dagegen das b-Allel des Elters 93/1-119 nicht in der Nachkommenschaft auf. Wird die Vererbung nicht – z.B. durch ein Selbstinkompatibilitätssystem – beeinflusst, dann sollte die SSCP-Analyse für beide Populationen dasselbe Bandenmuster zeigen (Punnett-Square unter 1.3 *Selbstinkompatibilität*).

Aufgrund der unterschiedlichen Aufspaltungen in den Nachkommenschaften war es möglich den Banden entsprechende Allele zuzuordnen und auch bei der Auswertung entsprechend zu berücksichtigen. Die Auswertung erfolgte kodominant ab x ac.

Tab. 14: *Spaltungsmuster der Nachkommenschaft 94/1 für die Primerpaare TE3 und TE4.* Die Allele aa und ac werden durch das Selbstinkompatibilitätssystem ausgeschlossen. Durch die daraus entstehende verschobene Spaltung ist der χ^2 -Wert sehr hoch.

Primerpaar	Genotyp 93/1-117 ♂	Genotyp 93/1-119 ♀	aa	ab	ac	bc	χ^2
TE3	ac	ab	--	--	38	40	65,98
TE4	ac	ab	--	--	40	48	79,54

Die Kartierung der Rosen-TE3 und -TE4 Marker erfolgte ebenso wie die Daten der Rückkreuzungen auf der Kopplungsgruppe drei der Population 94/1. Nachfolgend ist ein Ausschnitt der Kopplungsgruppe drei mit den kartierten Markern TE3 und TE4 dargestellt. Die beiden Marker zeigen keine Rekombination untereinander und 12 Rekombinante zu dem Merkmal Selbstinkompatibilität. Eine vollständige Darstellung der Rosenkopplungskarte der Population 94/1 ist unter 4.3 *Rosenkopplungskarte 94/1*, sowie für die entsprechende Kartierung der TE3 und TE4 Marker in der Population 97/7 unter 4.4 *Erweiterung der Rosenkopplungskarte 97/7* dargestellt.

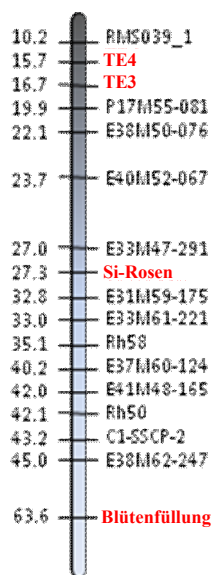


Abb. 33: *Ausschnitt aus der Rosenkopplungskarte 94/1.* Die TE3 und TE4 Sequenzen sind nahezu identisch zu den entsprechenden Sequenzen der Prunus-Referenzkarte. In der Referenzkarte kartieren sie ohne Rekombination zum Si-Locus. In der Population 94/1 kartieren sie auf der gleichen Kopplungsgruppe wie der aus Rückkreuzungsversuchen ermittelte Si-Locus von Rosen.

Außer den TE 3 und TE 4 Primern wurden auch noch zu weiteren Sequenzen aus der TxE-Karte Primer erstellt. In der nachstehenden Abbildung sind die Primer neben den dazugehörigen EST-Sequenzen aus der Referenzkarte zur Übersicht dargestellt. Da inzwischen sehr viele neue EST-Sequenzen hinzugekommen sind, sind nicht mehr alle zusammen dargestellt, können aber auf der GDR-Website wie in der Abbildung 34 ebenfalls dargestellt, einzeln aufgerufen werden.

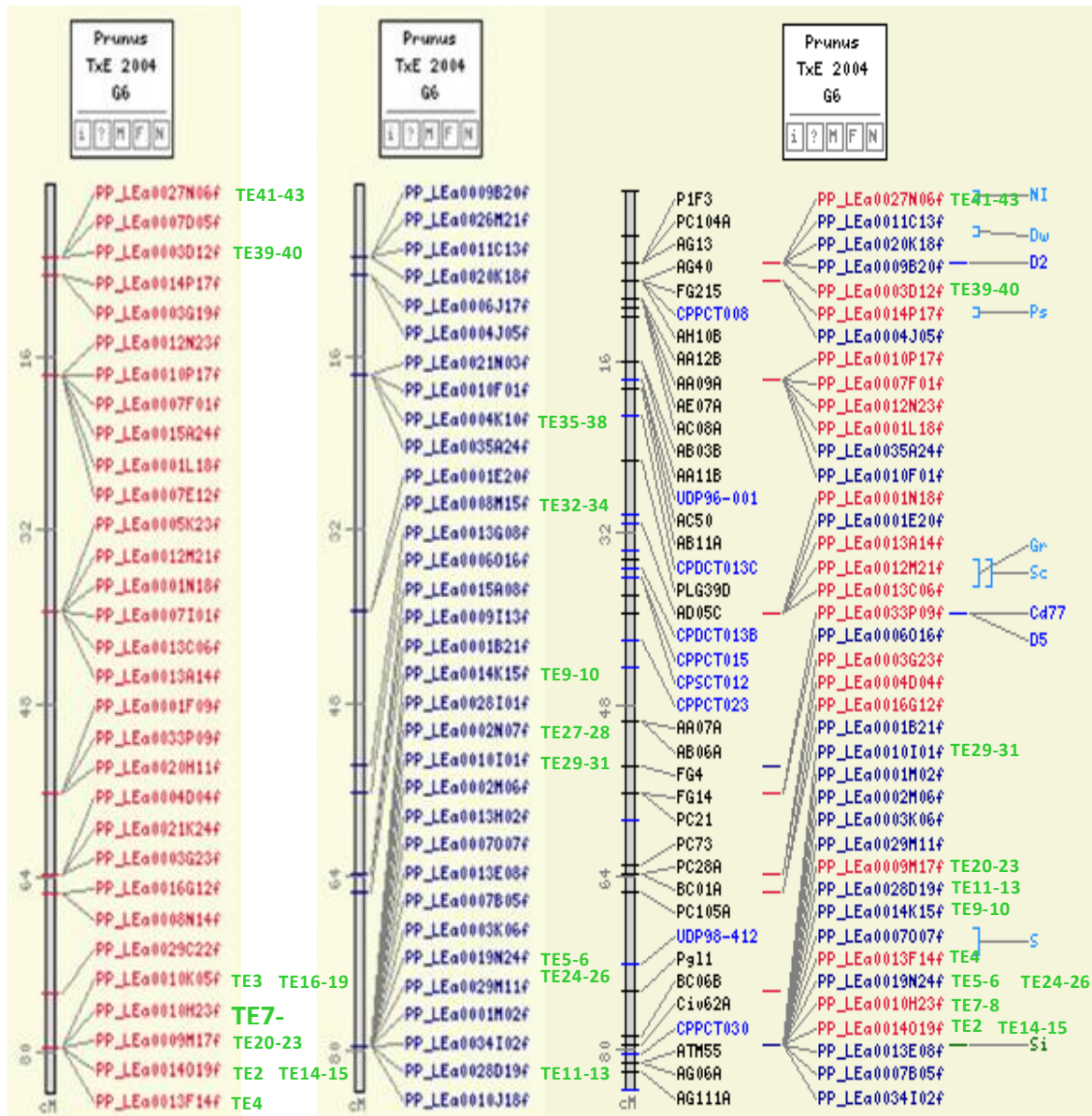


Abb. 34: Kopplungsgruppe sechs aus der Prunus-Referenzkarte mit selbsterstellten TE-Primern (in grün). Es wurden hauptsächlich Sequenzen gewählt, die in unmittelbarer Nähe zum Si-Locus bei Prunus liegen.

Alle TE-Primer wurden mit den Eltern der Pop. 94/1 getestet. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt. TE3 wurde außerdem auch in der Kopplungskarte der Population 97/7 lokalisiert (4.4 Erweiterung der Rosenkopplungskarte 97/7), nachdem festgestellt wurde, dass der Locus in der Nähe des Si-Locus bei Rosen kartiert.

Tab. 15: Ergebnisse der analysierten TE-Primer. Es wurden je *Prunus*-Sequenz (http://www.bioinfo.wsu.edu/cgi-bin/gdr/cmap/map_set_info?mapset_aid=43) mehrere Primerpaare erstellt.

Gen	Primer	PCR -Produkt	Annealingtemperatur	Fragmentgröße
PP_LEa0014019f	TE2	unspez.	Gradient	--
PP_LEa0010K05f	TE3	Ja	60°C	1100bp
PP_LEa0013F14f	TE4	Ja	60°C	750bp
PP_LEa0019N24	TE5	Ja	60°C	400bp
PP_LEa0019N24	TE5+6	Ja	60°C	420bp
PP_LEa0019N24	TE6+6	Zwei	60°C	400+900bp
PP_LEa0010H23f	TE7	unspez.	Gradient	--
PP_LEa0010H23f	TE8+7	Nein	Gradient	--
PP_LEa0014K15f	TE9	unspez.	Gradient	--
PP_LEa0014K15f	TE10	Ja	50°C	650bp
PP_LEa0028D19f	TE11	Nein	Gradient	--
PP_LEa0028D19f	TE12+11	Nein	Gradient	--
PP_LEa0028D19f	TE13	unspez.	Gradient	--
PP_LEa0014O19f	TE14	unspez.	Gradient	--
PP_LEa0014O19f	TE14+15	Zwei Banden	55°C	500+550bp
PP_LEa0010K05f	TE16	Ja	60°C	1000bp
PP_LEa0010K05f	TE16+17	Ja	60°C	1000bp
PP_LEa0010K05f	TE18+16	unspez.	Gradient	--
PP_LEa0010K05f	TE18+19	Nein	Gradient	--
PP_LEa0009M17f	TE20	Ja	60°C	600bp
PP_LEa0009M17f	TE21+20	unspez.	Gradient	--
PP_LEa0009M17f	TE22	Ja	Gradient	--
PP_LEa0009M17f	TE21+23	Ja	Gradient	--
PP_LEa0019N24	TE24	Zwei Banden	60°C	500+1000bp
PP_LEa0019N24	TE25	unspez.	Gradient	--
PP_LEa0019N24	TE26	Zwei Banden	60°C	ca. 600bp
PP_LEa0002N07f	TE27	Nein	Gradient	--
PP_LEa0002N07f	TE27+28	Nein	Gradient	--
PP_LEa0002N07f	TE28+27	Ja	60°C	1400bp
PP_LEa0002N07f	TE28	Ja	60°C	1600bp
PP_LEa0010I01f	TE29	unspez.	Gradient	--
PP_LEa0010I01f	TE29+31	unspez.	Gradient	--
PP_LEa0010I01f	TE30+29	unspez.	Gradient	--
PP_LEa0010I01f	TE31+29	unspez.	Gradient	--
PP_LEa0010I01f	TE31	unspez.	Gradient	--
PP_LEa0010I01f	TE30+31	unspez.	Gradient	--
PP_LEa0008M15f	TE32	unspez.	Gradient	--
PP_LEa0008M15f	TE33+32	unspez.	Gradient	--
PP_LEa0008M15f	TE34+32	Ja	60°C	ca. 400bp
PP_LEa0004K10f	TE35	Nein	Gradient	--
PP_LEa0004K10f	TE36+35	Nein	Gradient	--
PP_LEa0004K10f	TE35+37	unspez.	Gradient	--
PP_LEa0004K10f	TE36+37	Zwei Banden	55°C	250+800bp

PP_LEa0004K10f	TE38+35	unspec.	Gradient	--
PP_LEa0004K10f	TE38+37	Ja	55°C	550bp
PP_LEa0004K10f	TE38	Drei Banden	Gradient	300-500bp
PP_LEa0003D12f	TE39	mehrere	Gradient	--
PP_LEa0003D12f	TE40	Zwei Banden	Gradient	400+300bp
PP_LEa0003D12f	TE39+40	unspec.	Gradient	--
PP_LEa0003D12f	TE40+39	unspec.	Gradient	--
PP_LEa0027N06f	TE41	unspec.	Gradient	--
PP_LEa0027N06f	TE42	unspec.	Gradient	--
PP_LEa0027N06f	TE41+42	Ein bis zwei	50°C	ca. 600bp
PP_LEa0027N06f	TE42+41	unspec.	Gradient	--
PP_LEa0027N06f	TE41+43	unspec.	Gradient	--
PP_LEa0027N06f	TE43	unspec.	Gradient	--
PP_LEa0027N06f	TE42+43	Nein	Gradient	--
PP_LEa0027N06f	TE43+41	unspec.	Gradient	--
PP_LEa0027N06f	TE43+42	Zwei Banden	Gradient	350+550bp

Es wurden nur die PCR-Produkte sequenziert, die eine saubere Bande im Agarose-Gel gezeigt haben. Außerdem wurden die sequenzierten PCR-Produkte auch im SSCP-Gel auf Polymorphismen in der Nachkommenschaft analysiert. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 16 zusammengefaßt. PCR-Produkte, die mehrere Banden im Agarose-Gel zeigen, und dabei in der Nachkommenschaft aufspalten, wurden ebenfalls ausgewertet und kartiert.

Tab. 16: Ergebnisse der Sequenzanalyse von PCR-Produkten der TE-Primer.

Gen	Primer	Sequenzierung	Ähnlichkeit zur Originalsequenz	Polymorphismus
PP_LEa0010K05f	TE3	Ja	98,39%, zwei Introns	SSCP-Gel
PP_LEa0013F14f	TE4	Ja	97,04%, zwei Introns	SSCP-Gel
PP_LEa0019N24	TE5	Ja	92,25%	SSCP-Gel
PP_LEa0019N24	TE6	Ja	92,20%	--
PP_LEa0014K15f	TE10	Nein	--	Agarose-Gel
PP_LEa0010K05f	TE16	Ja	97,6%, zwei Introns	SSCP-Gel
PP_LEa0009M17f	TE22	Nein	--	Agarose-Gel
PP_LEa0009M17f	TE21+23	Nein	--	Agarose-Gel
PP_LEa0002N07f	TE28+27	Nein	--	Nein
PP_LEa0002N07f	TE28	Ja	59,5%, ein Intron	SSCP-Gel
PP_LEa0008M15f	TE34+32	Ja	63%	Nein
PP_LEa0004K10f	TE36+37	Nein	--	Agarose-Gel
PP_LEa0003D12f	TE39	Nein	--	Agarose-Gel

Die untersuchten Sequenzen von TE3, TE4, TE5, TE6 und TE16 entsprechen den Originalsequenzen aus der *Prunus*-Referenzkarte mit mindestens 92,20% bis 98,39%. Die Sequenz des Primerpaares TE28 zeigt nur eine Übereinstimmung von 59,5% und TE34+32 zeigt 63% Übereinstimmung zur Originalsequenz. Das Primerpaar TE28 amplifiziert nicht die erwartete Sequenz. Insgesamt konnten für zehn Primerpaaren 11 TE-Loci für die Population 94/1 kartiert werden.

4.2.2.2 Isolierung von Rosenhomologen zu SI Genen anderer Rosaceae

Für die Untersuchung der Si-Komponenten SFB, S-RNase und HT-B in Rosen wurden sowohl Primer aus Veröffentlichungen verwendet als auch degenerierte Primer aus Sequenzen verwandter Arten mit Primer3 erstellt. In den nachfolgenden Tabellen 17 bis 19 sind alle getesteten Primer, Amplifikation, Größe und Referenzdaten dargestellt.

Tab. 17: Primer für S-Locus spezifische F-Box-Proteine. Die PCR-Primer stammten aus Veröffentlichungen oder wurden mit Primer3 aus veröffentlichten Sequenzen für S-Locus spezifische F-Box-Proteine erstellt. Die Tabelle zeigt die PCR-Ergebnisse. Das Primerpaar Si15 wurde für weitere Analysen eingesetzt und die amplifizierte Sequenz diente zudem als Vorlage für die Erstellung weiterer PCR-Primer.

Primerbezeichnung	Nummerierung	Amplifikation	Fragmentgröße	Literatur
SLFL2	Si5	Ja, schwach	ca. 400bp	SONNEVELD et al., 2005
S6-exon-F1	Si6	Ja, schwach	ca. 500bp	HAUCK et al., 2006
S6-C3R-Primer				
SFB-1rev	Si8	Ja, aber auch un spez.	500bp	ROMERO et al., 2004
SFB-5forw	Si8b			
SFB-1rev	Si8	Drei Banden	200, 500, 1100bp	ROMERO et al., 2004
SFB-6forw	Si8c			
SFBc-F	Si15	Ja	1000bp	ROMERO et al., 2004
SFBc-R				
RFB1-F	Si18	Nein	--	ROMERO et al., 2004
SFBcR	Si15			
RFB2-F	Si19	un spez.	--	ROMERO et al., 2004
SFBc-R	Si15			
PaSFB3-F	Si20	Nein	--	SONNEVELD et al., 2005
PaSFB3-R				
PaSFB4-F	Si21	Nein	--	SONNEVELD et al., 2005
PaSFB4-R				
PcSFB26-F	Si24	Nein	--	HAUCK et al., 2006
PcSFB26-R				
SFBfF1	Si25	Zwei Banden	ca. 1600bp	USHIJIMA et al., 2004
SfinsR0				
SCa01F	Si26			USHIJIMA et al., 2004
SLFLF3	Si27	Zwei Banden	ca. 500bp	USHIJIMA et al., 2004
SLFLR3				
SLFL3F2	Si28	Drei Banden	ca. bei 500bp	USHIJIMA et al., 2004
SLFL3F2				
Primer für Si15:	SFB1for+rev	Ja	ca. 400bp	
	SFB2forw	Ja, schwach	ca. 700bp	
	SFB1rev			
	SFB1forw	Ja	ca. 700bp	
	SFB2rev			
	SFB2forw+rev	Ja	ca. 700bp	
	SFB3forw+rev	Ja	ca. 400bp	
	SFB1forw	Ja	ca. 700bp	
	SFB4rev			
	SFB2forw	Ja	ca. 700bp	
	SFB4rev			
	SFB5forw+rev	Ja	500bp	
	SFB6forw	Ja	500bp	
	SFB5rev		1000bp	
	SFB7forw+rev	Nein	--	
	SFB8forw	Ja	1000bp	
	SFB7rev			
	SFB9forw	un spez.	--	
	SFB8rev			

SFB10forw+rev	unspez.	--
SFB11forw SFB10rev	Ja	1200bp
SFB10forw SFB12rev	Ja	1000bp
SFB13forw SFB12rev	Ja	1000bp
IntronSFB2f+r	Ja	300bp
IntronSFB2f+2r	Nein	--
SFB1213	Ja	mehrere
SFB1289	Ja	mehrere

Tab. 18: Primer für die Griffelkomponente des Si-Systems (S-RNase). Die PCR-Primer stammten aus Veröffentlichungen oder wurden mit Primer3 aus veröffentlichten Sequenzen für S-RNasen erstellt. Die Tabelle zeigt die PCR-Ergebnisse.

Primerbezeichnung	Nummerierung	Amplifikation	Fragmentgröße	Literatur
Pru-C2 Pru-C4R	Si7forw+rev	unspez.	--	TAO et al., 1999
1824 1825	Si9forw+rev	Nein	--	KAUFMANN Diss., 1991
	Si10forw+rev	schwach	1000bp	--
	Si10forw Si10brev	schwach	500bp	--
	Si11forw+rev	Ja	1500bp	--
	Si12forw+rev	Nein	--	--
	Si13forw+rev	Nein	--	--
SRc-F Pru_C5	Si14forw+rev	Nein	--	ROMERO et al., 2004
RS1-F Pru-C4R	Si16forw Si7rev	schwach	250,550bp	TAO et al., 1999
RS2-F Pru-C4R	Si17forw Si7rev	Nein	--	TAO et al., 1999
Ishimizu-F und -R	Si22	schwach	1600bp	ISHIMIZU et al., 1998
PcS13-F und -R	Si23	unspez.	--	HAUCK et al., 2006
	Si29	Ja	200 u. 800bp	--
	Si30	Nein	--	--
	Si31	Ja	300+500bp	--
ROS4und 5	--	Ja, unspez.	--	--
C1 und C5	--	Nein	--	SONNEVELD et al., 2001

Tab. 19: Primer für andere Si-Komponenten.

Gen	Primerbezeichnung	Amplifikation	Fragmentgröße	Literatur
120k	120kf+r	Ja	800bp	HANCOCK et al., 2005
HT-B	HT-NS1+2	Nein	--	O`BRIEN et al., 2002
HT-B	HT-C1+2	Nein	--	O`BRIEN et al., 2002

Die molekularbiologischen Untersuchungen der beiden Hauptkomponenten S-RNase und SFB werden nachfolgend einzeln besprochen, die Komponenten HT-B und 120k wurden nach nicht erfolgter Amplifikation nicht näher untersucht.

Identifizierung der Rosen-SFB-Sequenz

Für die Analyse der SFB-Sequenz wurden alle PCR-Produkte sequenziert, die eine saubere Bande im Agarose-Gel gezeigt haben. Die Primerpaare Si5, Si6 und Si15 führen alle zur gleichen Sequenz. Da sich das Primerpaar Si15 als stabiler erwies, während die anderen Primerpaare nicht immer zu einer Amplifikation führten, wurde dieses Primerpaar bzw. PCR-Produkt zur Analyse herangezogen.

Nach erfolgreicher Sequenzierung des Si15-PCR-Produktes erfolgte mittels NCBI-BLAST ein Abgleich in der Datenbank. Das Ergebnis dieser Analyse ist eine hohe Übereinstimmung zu diversen S-Locus-spezifischen SFB-Proteinen. Die Übereinstimmungen beziehen sich ausschließlich auf SFB-Proteinen und sind in der Abbildung 35 dargestellt.

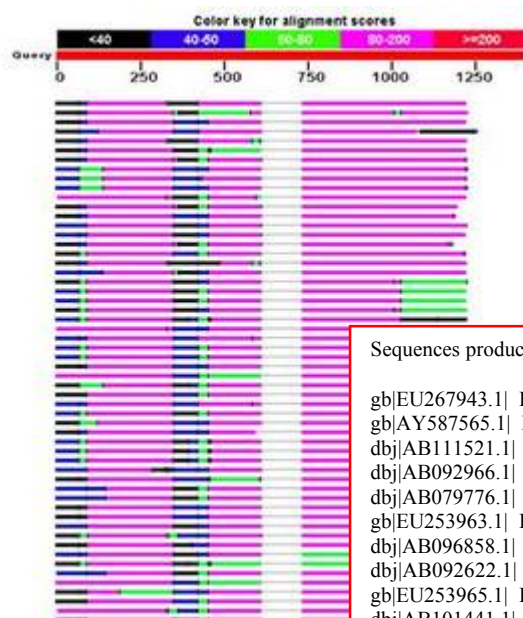


Abb. 35: BLAST-Ergebnis für die Sequenz des Primerpaares Si15 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Alle Übereinstimmungen beziehen sich auf SFB-Proteine, die besten zehn Übereinstimmungen sind im roten Kasten aufgeführt.

Sequences producing significant alignments:		(Bits)	Value	N
gb EU267943.1	Prunus pseudocerasus F-box protein (SFBc) mRNA...	178	3e-121	1
gb AY587565.1	Prunus armeniaca S-locus F-box protein 4 (SFB4...	184	4e-120	1
dbj AB111521.1	Prunus avium SFB4 mRNA for S haplotype-specif...	186	2e-119	1
dbj AB092966.1	Prunus dulcis SFBa mRNA for S haplotype-speci...	174	2e-119	1
dbj AB079776.1	Prunus dulcis SFBc mRNA for S haplotype-speci...	173	5e-118	1
gb EU253963.1	Prunus pseudocerasus S-haplotype-specific F-bo...	184	5e-118	1
dbj AB096858.1	Prunus avium SFB6 mRNA for S-locus F-Box prot...	185	1e-117	1
dbj AB092622.1	Prunus mume S7-SLF mRNA for F-box, complete cds	182	4e-117	1
gb EU253965.1	Prunus pseudocerasus S-haplotype-specific F-bo...	180	2e-116	1
dbj AB101441.1	Prunus mume SFB7 mRNA for S-locus F-Box prote...	182	4e-116	1

Die Sequenzanalyse mittels Alignment in BioEdit ergibt eine hohe Übereinstimmung mit SFB-Sequenzen von *Prunus pseudocerasus* und *Prunus armeniaca* (Abb. 36), sowie auch zwischen den Rosengentypen 93/1-117 und -119, Sp3 und 95/13 (Elter der Population 97/7). Es wurden durch Vergleiche zwischen genomischen Sequenzen und cDNA-Sequenzen des Primerpaares Si15 zwei Introns ermittelt, die auch durch den Vergleich mit *Prunus*-Sequenzen bestätigt werden. Sie sind in der Abb. 36 durch rote Kästchen gekennzeichnet.

10 20 30 40 50 60 70

Si15 117 a_M13uni TCGACATCCCTAGTAAGACTACCTGCAAAAACCCCTAA

Si15 117 b_M13uni TCGACATCCCTAGTAAGACTACCTGCAAAAACCCCTAA

Si15 119 a_M13uni TCGACATCCCTAGTAAGACTACCTGCAAAAACCCCTAA

Si15 119 b_M13uni TCGACATCCCTAGTAAGACTACCTGCAAAAACCCCTAA

Si15 95/13 a_M13uni TCGACATCCCTAGTAAGACTACCTGCAAAAACCCCTAA

Si15 95/13 b_M13uni TCGACATCCCTAGTAAGACTACCTGCAAAAACCCCTAA

Si15 Sp3 a_M13uni TCGACATCCCTAGTAAGACTACCTGCAAAAACCCCTAA

Si15 Sp3 c_M13rev TCGACATCCCTAGTAAGACTACCTGCAAAAACCCCTAA

GenomeWalkingSFBcomplete ATGACGTCCACAACCTCCG -AGGAAATCGTGTTCGACATCCCTAGTAAGACTACCTGCAAAAACCCCTAA

Prunus pseudocerasus SFB-5 ATGTCATTTACACTATGTAAGAAGAAATCTTAAATGACATCCCTAGTAAGACTACCTGCAAAAACCCCTCG

Prunus pseudocerasus SFB-1 ATGACATTTGGCAGCAGTAAAGAAGAAATCCTGATCGACATCCCTAGTAAGACTACCTGCAAAAACCCCTCG

Prunus pseudocerasus SFB-7 ATGACATTTCACTGCGTAAGAAGAAATCTTAAATCGACATCCCTAGTAAGACTACCTGCAAAAACCCCTCG

Prunus pseudocerasus SFBc-s ATGACATTTCAACTAGGTAAGAAGAAATCTTAAATCGACATCTAGCAAGACTACCTGCAAAAACCCCTGG

Prunus armeniaca SFB1 TCGACATCCCTAGTAAGACTACCTGCAAAAACCCCTCG

Prunus armeniaca SFB2 TCGACATCCCTAGTAAGACTACCTGCAAAAACCCCTCG

Prunus armeniaca SFB4 TCGACATCCCTAGTAAGACTACCTGCAAAAACCCCTCG

80 90 100 110 120 130 140

Si15 117 a_M13uni TCGCGTTTTTATGTGCATGCAAAAGCATGGAGTGATTTGATTAGCAGCCAGATTTTGTCTCTCAAAATCT

Si15 117 b_M13uni TCGCGTTTTTATGTGCATGCAAAAGCATGGAGTGATTTGATTAGCAGCCAGATTTTGTCTCTCAAAATCT

Si15 119 a_M13uni TCGCGTTTTTATGTGCATGCAAAAGCATGGAGTGATTTGATTAGCAGCCAGATTTTGTCTCTCAAAATCT

Si15 119 b_M13uni TCGCGTTTTTATGTGCATGCAAAAGCATGGAGTGATTTGATTAGCAGCCAGATTTTGTCTCTCAAAATCT

Si15 95/13 a_M13uni TCGCGTTTTTATGTGCATGCAAAAGCATGGAGTGATTTGATTAGCAGCCAGATTTTGTCTCTCAAAATCT

Si15 95/13 b_M13uni TCGCGTTTTTATGTGCATGCAAAAGCATGGAGTGATTTGATTAGCAGCCAGATTTTGTCTCTCAAAATCT

Si15 Sp3 a_M13uni TCGCGTTTTTATGTGCATGCAAAAGCATGGAGTGATTTGATTAGCAGCCAGATTTTGTCTCTCAAAATCT

Si15 Sp3 c_M13rev TCGCGTTTTTATGTGCATGCAAAAGCATGGAGTGATTTGATTAGCAGCCAGATTTTGTCTCTCAAAATCT

GenomeWalkingSFBcomplete TCGCGTTTTTATGTGCATGCAAAAGCATGGAGTGATTTGATTAGCAGCCAGATTTTGTCTCTCAAAATCT

Prunus pseudocerasus SFB-5 TTCGGTTTCCTTTGTACATGCAAGTCATGGATGGATTTGATTGGCAGCTCCAGTTTTGTAGACACACCT

Prunus pseudocerasus SFB-1 TTCGATTTCTGTACATGCAAGTCATGGAGTGATTTGATTGGCAGCTCCAGTTTTGTAGCACACACT

Prunus pseudocerasus SFB-7 TTCGGTTTCCTGTGTACATGCGAGTCATGGAGTGATTTGATTGGCAGCTCCAGTTTTGTAGCGTACACT

Prunus pseudocerasus SFBc-s TTCGGTTTCCTTTGTACATGCAAGTCATGGAGTGATTTGATTGGCAGCTCCAGTTTTGTAGCACACATAT

Prunus armeniaca SFB1 TTCGGTTTCCTGTGTACATGCAAGTCATGGAGTGATTTGATTGGCAGCTCCAGTTTTGTAGCACACACT

Prunus armeniaca SFB2 TTCGGTTTCCTGTGTACATGCGAGTTATGGGTTGATTTGATTGGCAGCTCCAGTTTTGTAGCACACACT

Prunus armeniaca SFB4 TTCGGTTTATGTGTACATGTAAGTCATGGAGTGATTTGATTGGCAGCTCCAGTTTTGTAGCACACACT

150 160 170 180 190 200 210

Si15 117 a_M13uni TAAACAAAATATCACAAAACGAGAAAATATGCATCTACTCTGCCTCCACCACCCGGATTTTAAACGGGTG

Si15 117 b_M13uni TAAACAAAATATCACAAAACGAGAAAATATGCATCTACTCTGCCTCCACCACCCGGATTTTAAACGGGTG

Si15 119 a_M13uni TAAACAAAATATCACAAAACGAGAAAATATGCATCTACTCTGCCTCCACCACCCGGATTTTAAACGGGTG

Si15 119 b_M13uni TAAACAAAATATCACAAAACGAGAAAATATGCATCTACTCTGCCTCCACCACCCGGATTTTAAACGGGTG

Si15 95/13 a_M13uni TAAACAAAATATCACAAAACGAGAAAATATGCATCTACTCTGCCTCCACCACCCGGATTTTAAACGGGTG

Si15 95/13 b_M13uni TAAACAAAATATCACAAAACGAGAAAATATGCATCTACTCTGCCTCCACCACCCGGATTTTAAACGGGTG

Si15 Sp3 a_M13uni TAAACAAAATATCACAAAACGAGAAAATATGCATCTACTCTGCCTCCACCACCCGGATTTTAAACGGGTG

Si15 Sp3 c_M13rev TAAACAAAATATCACAAAACGAGAAAATATGCATCTACTCTGCCTCCACCACCCGGATTTTAAACGGGTG

GenomeWalkingSFBcomplete TAAACAAAATATCACAAAACGAGAAAATATGCATCTACTCTGCCTCCACCACCCGGATTTTAAACGGGTG

Prunus pseudocerasus SFB-5 TCATAGGAAATGTCACAAAACATGCCCATGCTCTATCTGCTTTGCCCTCCACCACCCAAATTTTGAACGTCAG

Prunus pseudocerasus SFB-1 TAAACAAAATATCACAAAACGAGAAAATATGCATCTACTCTGCCTCCACCACCCAAATTTTGAACGTCAG

Prunus pseudocerasus SFB-7 TAAACAAAATATCACAAAACGAGAAAATATGCATCTACTCTGCCTCCACCACCCAAATTTTGAACGTCAG

Prunus pseudocerasus SFBc-s TAAACAAAATATCACAAAACGAGAAAATATGCATCTACTCTGCCTCCACCACCCAAATTTTGAACGTCAG

Prunus armeniaca SFB1 TAAACAAAATATCACAAAACGAGAAAATATGCATCTACTCTGCCTCCACCACCCAAATTTTGAACGTCAG

Prunus armeniaca SFB2 TAAACAAAATATCACAAAACGAGAAAATATGCATCTACTCTGCCTCCACCACCCAAATTTTGAACGTCAG

Prunus armeniaca SFB4 TAAACAAAATATCACAAAACGAGAAAATATGCATCTACTCTGCCTCCACCACCCAAATTTTGAACGTCAG

220 230 240 250 260 270 280

Si15 117 a_M13uni GTCGATTTGGAGGATCCATATGTTAAACAAGCTCTTCAATGGTCTTTCTTTCACTATGAAACATTTGAGC

Si15 117 b_M13uni GTCGATTTGGAGGATCCATATGTTAAACAAGCTCTTCAATGGTCTTTCTTTCACTATGAAACATTTGAGC

Si15 119 a_M13uni GTCGATTTGGAGGATCCATATGTTAAACAAGCTCTTCAATGGTCTTTCTTTCACTATGAAACATTTGAGC

Si15 119 b_M13uni GTCGATTTGGAGGATCCATATGTTAAACAAGCTCTTCAATGGTCTTTCTTTCACTATGAAACATTTGAGC

Si15 95/13 a_M13uni GTCGATTTGGAGGATCCATATGTTAAACAAGCTCTTCAATGGTCTTTCTTTCACTATGAAACATTTGAGC

Si15 95/13 b_M13uni GTCGATTTGGAGGATCCATATGTTAAACAAGCTCTTCAATGGTCTTTCTTTCACTATGAAACATTTGAGC

Si15 Sp3 a_M13uni GTCGATTTGGAGGATCCATATGTTAAACAAGCTCTTCAATGGTCTTTCTTTCACTATGAAACATTTGAGC

Si15 Sp3 c_M13rev GTCGATTTGGAGGATCCATATGTTAAACAAGCTCTTCAATGGTCTTTCTTTCACTATGAAACATTTGAGC

GenomeWalkingSFBcomplete GTCGATTTGGAGGATCCATATGTTAAACAAGCTCTTCAATGGTCTTTCTTTCACTATGAAACATTTGAGC

Prunus pseudocerasus SFB-5 GTTGACCCCTGATGACCCATATGTTGACAAGAACTTCAATGGTCTCTGTTTTGCAACGAAACGTTTGAGC

Prunus pseudocerasus SFB-1 GACGACCCCTGATGACCCATATGTTAAACAAGAAATTTCACTGGTCTCTTTTTTCGAATGAAACATTTGAGG

Prunus pseudocerasus SFB-7 GCAGACCCCTGATGACCCATATGTTGACAAGAAATTTCACTGGTCTCTTTTTTCGAATGAAACATTTGAGG

Prunus pseudocerasus SFBc-s AATGACAACGATGACCCATTTTGAAGAAGAACTTCAATGGTCACTTTTTTCAATGAAACATTTGAGC

Prunus armeniaca SFB1 GCCGACCCCTGATGACCCATATGTTAAACAAGAAATTTAGCTGGTCTCTTTTTTCGAATGAAACATTTGAGG

Prunus armeniaca SFB2 AACGACACTGATGACCCATATGACATAGAAGAACTTCAATGGTCACTTTTTTCCAAAGAAACATTTGAGC

Prunus armeniaca SFB4 GTTGACCCCTGATGACCCATATTTAGAAGAAGAACTTCAATGGTCTCTTTTTTCCAAATGAAACATTTGAGG

Prunus pseudocerasus SFB-7 GCAGACCCCTGATGACCCATATGTTGACAAGAAATTTCACTGGTCTCTTTTTTCGAATGAAACATTTGAGG

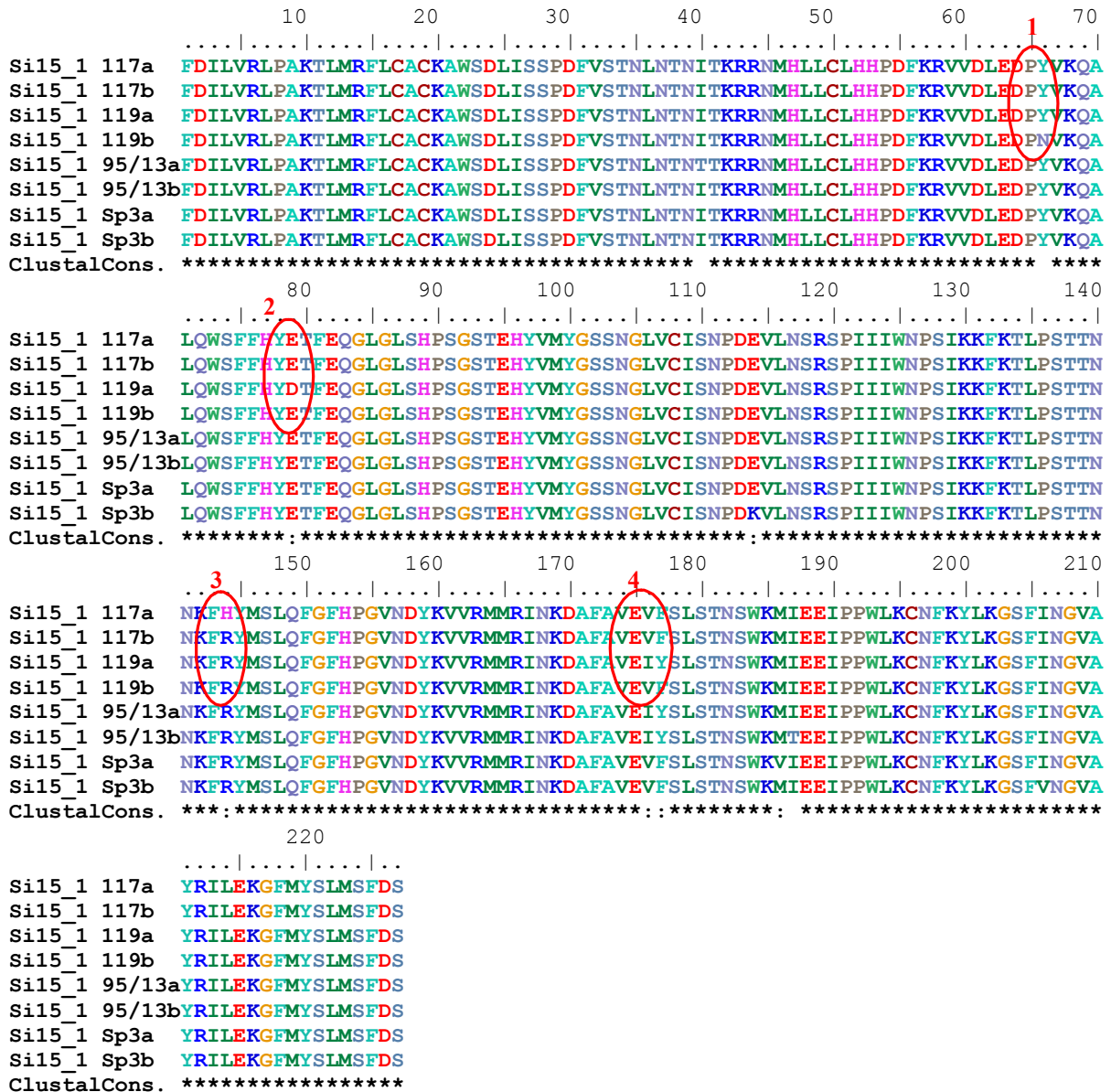


Abb. 37: *Alignment von Si15-Protein-Sequenzen.* Die Unterschiede in der Aminosäurestruktur zwischen den Eltern der Population 94/1 sind zur leichteren Übersicht mit rot umrandet. Die Doppelpunkte der Clustal Consensus Sequenz stehen für Aminosäuren, die sich in ihrer Funktion ähneln. Unterschied 1 zeigt keine Aminosäuren mit ähnlicher Funktion. Die anderen Aminosäureaustausche können trotz Austausch die gleiche Funktion ausführen.

Die PCR-Produkte, die mit dem Primerpaar Si15 amplifiziert wurden, zeigten weder im Agarose-Gel noch in der SSCP-Analyse einen Polymorphismus in der Nachkommenschaft. Die vorhandene Sequenz wurde mittels 3'-RACE und GenomeWalking (3.7 RACE und 3.8 GenomeWalking) verlängert, um die flankierenden DNA-Regionen anschließend auf DNA-Polymorphismen zu untersuchen (Abb. 38).

Die Gesamtsequenz wurde bereits in der Abbildung 36 miteinbezogen.

Die mit den Primerpaar Si15 ermittelte DNA-Sequenz mit 860bp Länge wurde mit Genome Walking um 1180bp und 3`RACE um 570bp verlängert (Abb. 38). Das 5`RACE ergab kein Ergebnis, so dass der vermutliche Translationsstart des SFB-Gen nur durch Alignment mit vorhandenen SFB-Sequenzen von *Prunus* ermittelt werden konnte (Abb. 36).

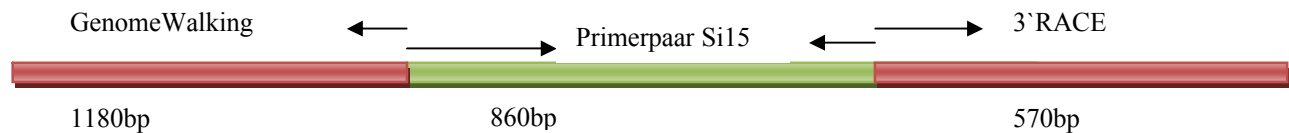


Abb. 38: Verlängerung der Si15-DNA-Sequenz. Die Sequenzen aus GenomeWalking und PCR mit dem Primerpaar Si15 beziehen sich auf genomische DNA, die durch 3`RACE ermittelte Sequenz auf cDNA.

Die ermittelte DNA-Gesamtsequenz wurde mit bekannten SFB-Sequenzen von *Prunus* verglichen um den Beginn des SFB-Gens ermitteln zu können. Das Gen-Ende wurde mit 3`RACE ermittelt (Abb 39).

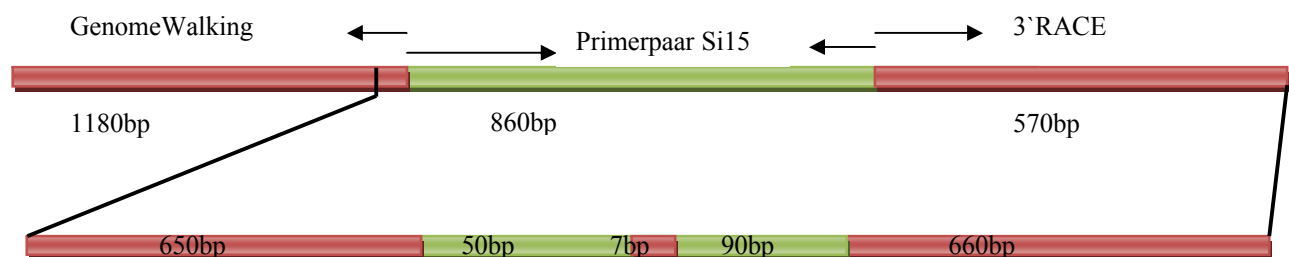


Abb. 39: SFB-Struktur. Die roten Bereiche stellen Exons und die grünen Bereiche sind die durch Alignments zwischen cDNA- und genomischen DNA- Sequenzen ermittelte Introns

Für die Kartierung wurde ein weiteres Primerpaar SFB2+2, erstellt auf Basis der bekannten Sequenz, verwendet. Die PCR-Sequenz des Primerpaares SFB2+2 ist in der Abbildung 39 durch eine blaue Umrandung gekennzeichnet. Zwischen SFB und Selbstinkompatibilität sind 35 Rekombinante und zwischen SFB und TE3 und TE4 sind 42 Rekombinationen in der Nachkommenschaft. Zwischen SFB und dem Merkmal Blütenfüllung sind 21 Rekombinationen in der Nachkommenschaft. Dennoch wurde SFB wie auch die Merkmale Selbstinkompatibilität und Blütenfüllung auf derselben Kopplungsgruppe kartiert.

Für die Kartierung des SFB-Gens wurden zusätzlich zu SFB2+2 weitere Marker mit Hilfe zusätzlicher Primerpaare (SFB1289 und SFB1213) entwickelt. Die SFB-Primer wurden anhand der verlängerten Sequenz beruhend auf dem Primerpaar Si15 erstellt und spalteten bereits im Agarose-Gel sichtbar auf (siehe nachfolgende Abbildung).

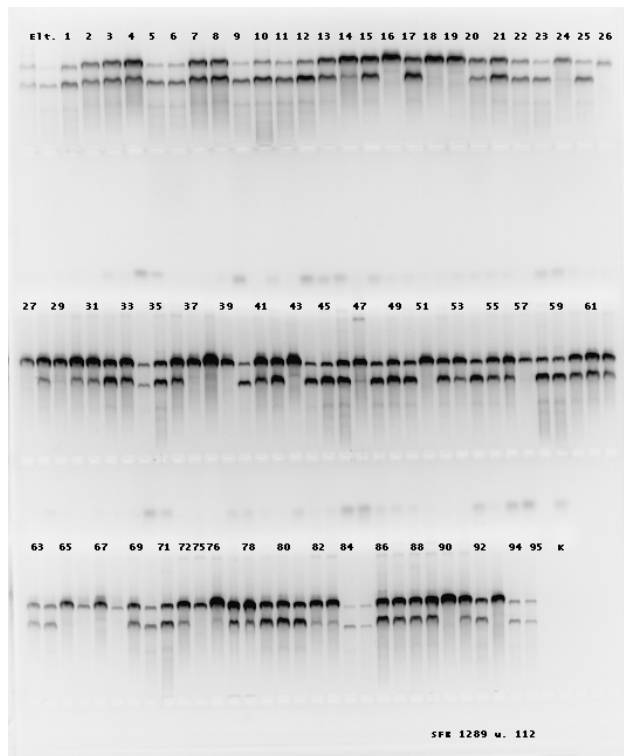


Abb. 40: Amplifikation des Primerpaares SFB1289+112. Die Primer wurden anhand der kompletten SFB-Sequenz (Abb. 38) erstellt. Die Aufspaltung der Pop. 94/1 kann im Agarose-Gel ermittelt und ausgewertet werden.

Alle SFB-Primerpaare wurden dominant ausgewertet und in dem Elter 93/1-119 kartiert (4.3 *Kartierung*).

Expressionsexperimente

Zur weiteren Überprüfung der Identität der möglichen SFB-Sequenz wurde eine Expressionsanalyse (Abb. 41) durchgeführt. Die Si-Gene werden nur in den entsprechenden Geweben exprimiert. Mit einer Expressionsanalyse kann untersucht werden, in welchen Geweben eine amplifizierte Sequenz exprimiert wird. Zur Untersuchung der Si-15 Sequenz wurde eine PCR mit cDNA von Antheren, Griffeln, Blättern und Petalen durchgeführt. Als Positiv-Kontrolle wurde genomische DNA des Genotyps 93/1-119 verwendet. Zuvor wurde die cDNA mit einer Actin-PCR auf Reinheit kontrolliert, da ein Vorhandensein von genomischer DNA das Ergebnis verfälschen würde.

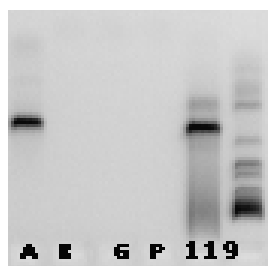


Abb. 41: Expressionsanalyse der SFB-Sequenz. Die Analyse wurde mit Antheren (A), Blättern (B), Griffeln (G), Petalen (P) und als Kontrolle mit genomischer DNA der Elternpflanze 93/1-119 durchgeführt. Außer der genomischen DNA konnte nur in Antheren ein PCR-Produkt amplifiziert werden. Die PCR-Sequenz aus Antheren ist kürzer als die genomische DNA, da die mRNA keine Introns enthält. Rechts ist die Kb-Leiter im Agarose aufgetragen.

Die Analyse der PCR-Produkte im Agarose-Gel zeigte nur für die genomische DNA und Antheren-cDNA eine Amplifikation (Abb. 41). Die PCR-Sequenz aus Antheren ist kürzer als

die der aus genomischer DNA, da die mRNA keine Introns enthält. Dies ist neben der zuvor erfolgten Kontrolle der cDNA eine weitere Bestätigung dafür, dass es sich nicht um eine Kontamination mit genomischer DNA handelt.

In Blättern (B), Griffeln (G) und Petalen (P) wird die mit dem Primerpaar Si15 amplifizierte Sequenz nicht exprimiert.

Untersuchungen zur Rosen-S-RNase

Für die molekularbiologische Untersuchung des S-RNase-Locus im Rosengenom wurden alle sauberen PCR-Banden aus dem Agarose-Gel eluiert und sequenziert. Die PCR-Produkte der Primerpaare Si7, Si10b und Si29 wurden genauer analysiert. Es war nicht möglich ein Alignment zwischen den ermittelten Sequenzen und *Prunus*-S-RNase-Sequenzen zu erstellen. Allerdings war es auch z. T. auch nicht möglich ein Alignment zwischen verschiedenen *Prunus*-S-RNase-Sequenzen zu erstellen, da die S-RNasen sehr polymorph sind.

Auch die BLAST-Analyse in NCBI ergab kein spezifisches Ergebnis, da die S-RNasen hoch polymorph sind und noch keine Sequenzen von Rosen bekannt sind.

Ermittlung der Rosen-S-RNase-Sequenz durch BAC-Klon-Analyse

Da die PCR-Sequenzen der Primerpaare Si7, Si10b und Si29 nicht durch Alignments mit *Prunus*-S-RNasen bestätigt oder ausgeschlossen werden konnten, wurde eine Analyse von BAC-Klonen (3. Methoden, 3.13 BAC-Klone) in die Untersuchung mit einbezogen. Hierzu wurden BAC-Klone (Abb. 42) ermittelt, welche die Sequenz des Primerproduktes Si15 enthalten. Ist die Sequenz des SFB-Proteins auf einem Klon lokalisiert, so besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit durch BAC-Klon-Sequenzierung auch die Sequenz der S-RNase zu ermitteln, da die beiden Komponenten des Si-Systems nah zusammen liegen müssen, um nicht durch Crossing over getrennt zu werden.

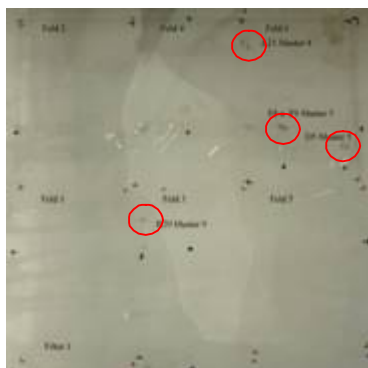


Abb. 42: Hybridisierung der BAC-Bank.
Auf dem Film sind die positiven Signale der Klone 65F8, 65F9, 65O5, 64A21, 33B20 zu erkennen.

Die Hybridisierung der BAC-Bank mit der radioaktiv markierten Si15-Sequenz hat klare Signale ergeben (Abb. 42), denen neun Klone zugeordnet werden konnten. Die Klone 65F8,

65F9, 65O5, 64A21, 130N4, 130N3, 33B20, 76K12 und 101A5 wurden mit HindIII einem Restriktionsverdau unterzogen, um die Klone auf Reinheit zu überprüfen und durch gemeinsame Banden zwischen den verschiedenen Klonen, die Bande zu ermitteln, die die SFB-Sequenz enthält (Abb. 43).

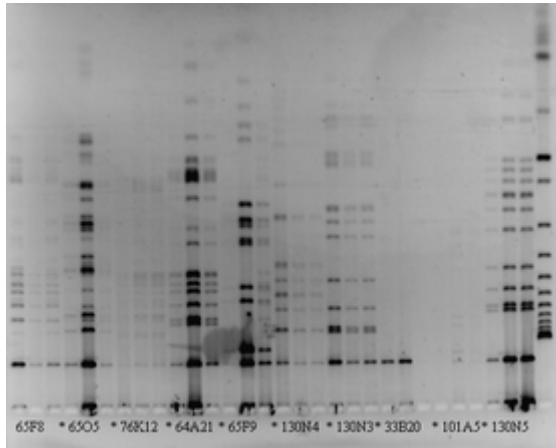
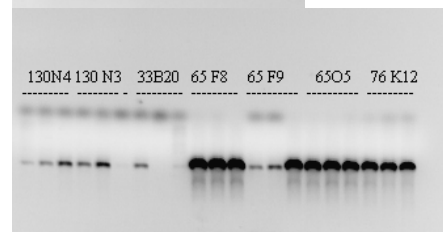
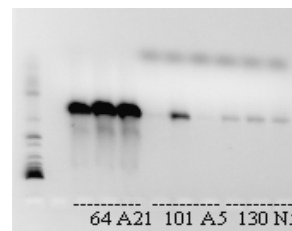


Abb. 44: Agarose-Gel zur Überprüfung der PCR mit den BAC-Klonen und dem Primerpaar Si15. Es wurden jeweils drei PCRs pro Klon durchgeführt und auf das Gel aufgetragen. Es wurden nur die Klone 64A21, 65F8, 65F9, 65O5 und 76K12 in weitere Analysen einbezogen.

Abb. 43: HindIII-Restriktionsverdau der BAC-Klone 65F8, 65F9, 65O5, 64A21, 130N4, 130N3, 33B20, 76K12 und 101A5. Das Bandenmuster (jeder Klon jeweils dreimal aufgetragen) bestätigt die Reinheit der Klone.



Von jedem neu ausgestrichenen Klon wurden je drei Klone weiter analysiert und alle zeigten das gleiche Bandenmuster nach HindIII Restriktionsverdau, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die BAC-Kultur jeweils nur einen Klon beinhaltetete.

Die Überprüfung der BAC-Klone mittels PCR mit dem Primerpaar Si15 (Abb. 44) ergab für die Klone 64A21, 65F8, 65F9, 65O5 und 76K12 eine zuverlässige Amplifikation. Die übrigen Klone wurden von weiteren Analysen ausgenommen. Zusätzlich zu der PCR-Überprüfung wurden die Klone nach HindIII-Restriktionsverdau mit einer Si15-Sonde hybridisiert (Abb. 45), da auch eine Zuordnung einer bestimmten Bande zur SFB-Sequenz nach HindIII bei der Vielzahl an Banden zu ungenau ist. Die Hybridisierung war erfolgreich und zeigte für den Klon 65O5 eine Abweichung gegenüber den Klonen 64A21, 65F8, 65F9, 64A21 und 76K12.



Abb. 45: Hybridisierung der BAC-Klone nach HindIII-Verdau mit einer Si15-Sonde. Der Klon 65O5 zeigt eine Abweichung gegenüber den Klonen 64A21, 65F8, 65F9, und 76K12.

Die BAC-Klone wurden von beiden Seiten ansequenziert, damit anhand der Sequenz Primer erstellt werden konnten. Mit den erstellten Primern wurde eine PCR mit der Annealingtemperatur von 62°C (siehe 3.6.3 *PCR-Standardprogramm*) durchgeführt.

Die Primer (siehe *Anhang*) wurden nach dem jeweiligen Klon benannt für den sie erstellt wurden und für die beiden Enden jeweils mit a und b bezeichnet. Die Nummer gibt die Basenzahl der Sequenz des jeweiligen Klons an, so dass die Differenz der beiden Primer-Nummern jeweils die erwartete Bandengröße ergibt, Bsp. Primerpaar 65O5aforw265 und 65O5arev428 sind Primerpaare für den Klon 65O5 und die erwartete Bandengröße ist $428-265=163\text{bp}$ (*Abb. 46* und *Abb. 47*).

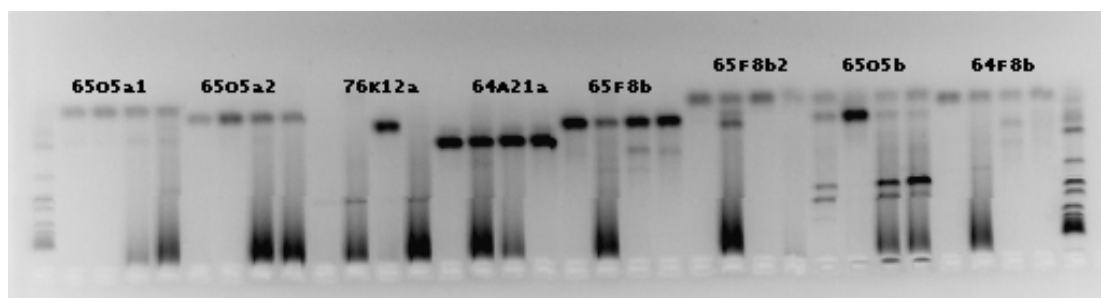


Abb. 46: Ausrichtung der BAC-Klone zueinander durch Analyse der BAC-Enden mittels PCR. Die Beschriftung bezieht sich auf die verwendeten Primerpaare, z.B. 65O5a und b sind für die Enden des 65O5-Klons erstellt worden. Wird die Sequenz von den anderen Klonen amplifiziert, dann überlappen sie sich an dieser Stelle. Die vier Ansätze bestehen aus den BAC-Klonen mit der Reihenfolge: 65F8, 65O5, 76K12 und 64A21.

Primerpaar	65F8	65O5	76K12	64A21
65F8a	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.
65O5a1+2	Ja	Ja	Ja	Ja
76K12a	Nein	Nein	Ja	Nein
64A21a	Ja	Ja	Ja	Ja
65F8b1+2	Ja	Nein	Ja	Ja
65O5b	Nein	Ja	Nein	Nein
76K12b	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.
64A21b	Ja	Ja	Ja	Ja

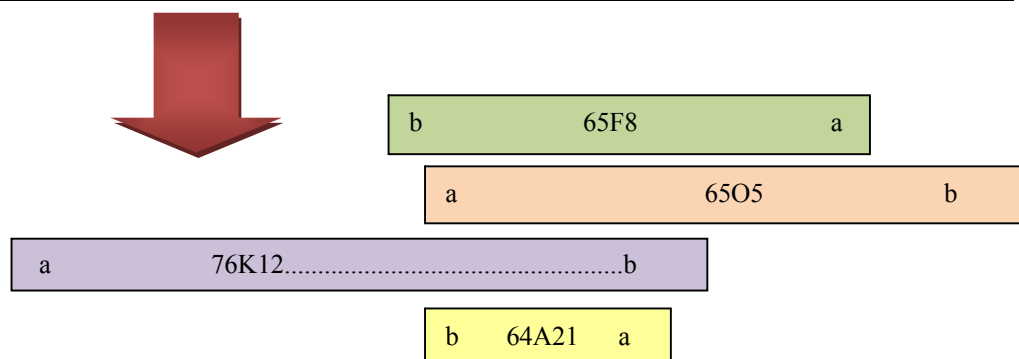


Abb. 47: Ergebnis der Ausrichtung der BAC-Klone zueinander. Oben ist die tabellarische Darstellung des Ergebnisses der PCR-Überprüfung im Agarose-Gel gezeigt. Eine Amplifikation (ja) belegt das Vorhandensein einer Sequenz, die in einem anderen Klon ermittelt wurde. Z.B. zeigt die Amplifikation des Primerpaares 65O5a im Genotyp 65F8, dass die Sequenz, die für ein Ende des Klons 65O5 ermittelt wurde, auch im Klon 65F8 vorhanden ist.

Unten ist die graphische Darstellung der Lokalisierung der BAC-Klone zueinander gezeigt, die sich aus den Ergebnissen (Tabelle) ergibt..

Die Lage der BAC-Klone im Rosengenom wurde durch PCR mit einem Primerpaar des Klons 65F8 in der Population 94/1 mit anschließender SSCP-Analyse kartiert (4.3 Kartierung). Die Aufspaltung in der Nachkommenschaft 94/1 mit 99 Individuen gleicht nach dominanter Auswertung mit nur einer Rekombinante der Aufspaltung für das Primerpaar SFB2+2. Dies bestätigt das Ergebnis der Hybridisierung, nach der die Sequenz des SFB2+2 Amplifikates in den BAC-Klonen lokalisiert ist.

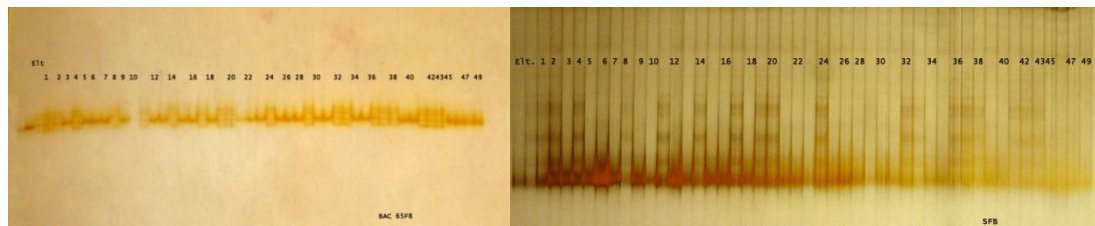


Abb. 48: PCR-Produkte der Primerpaare 65F8 und SFB2+2 (Pop. 94/1) im SSCP-Gel. Die Aufspaltung der Allele in der Nachkommenschaft ist für beide Primerpaare identisch.

Im SSCP-Gel läßt sich für beide Primerpaare die gleiche Aufspaltung in der Nachkommenschaft darstellen (Abb. 50).

Tab. 20: Spaltungsmuster der Primerpaare SFB2+2 und BAC65F8 in der Population 94/1.

Primerpaar	Genotyp 93/1-117	Genotyp 93/1-119	Genotyp aa	Genotyp ab	χ^2
SFB2+2	aa	ab	50	41	1,46
BAC65F8	aa	ab	49	41	1,46

Für die Analyse der S-RNase-Sequenzen wurde mit den S-RNase-Primern und der BAC-Klone eine PCR durchgeführt. Die S-RNase-Sequenz und SFB-Sequenz liegen im *Prunus*-Genom dicht zusammen und die Rosen-Sequenzen könnten daher gemeinsam auf den BAC-Klonen lokalisiert sein.

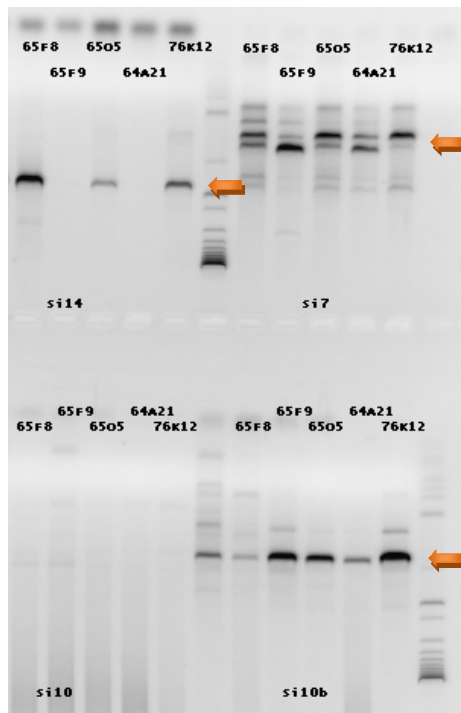


Abb. 49: Analyse von PCR-Produkten der Si-Primern 7, 10, 10b und 14. Für das Primerpaar Si14 zeigen drei BAC-Klone eine Amplifikation und für Si10b und Si7 zeigen alle vier BAC-Klone eine Amplifikation.

Für die Primerpaare Si 7, 10b und 14 konnte eine Amplifikation mit BAC-Klon-DNA festgestellt werden (Abb. 49). Die durch die oben genannten Primerpaare amplifizierten Sequenzen liegen demnach in unmittelbarer Nähe zur Si15-Sequenz.

Weitere Untersuchungen der Sequenzen durch BLAST in NCBI und Sequenzvergleiche mit bekannten S-RNase-Sequenzen in Bioedit ergab keine Übereinstimmung.

4.3 Rosenkopplungskarte der Population 94/1

Für die Population 94/1 konnten zehn Strukturgene für das Merkmal Ethylenempfindlichkeit kartiert werden. Die Primerpaare RhACS1, RhCTR1 und RhETR 2 amplifizierten in jeweils einem Elter für zwei Loci. Die Sequenzen der Primerpaare RhACS2, RhACS3, RhACS4, RhACS5, RhCTR2, RhETR3 und RhETR4 konnten jeweils nur in einem Elter kartiert werden. In der Tabelle 21 sind die einzelnen Primerpaare und die Kopplungsgruppen der Elter 93/1-117 und 93/1-119 aufgelistet und in der Abbildung 53 als Kopplungskarte dargestellt. Die Kopplungsgruppen, die mit A gekennzeichnet sind, gehören zum Elter 93/1-117, die mit B gekennzeichneten Kopplungsgruppen zum Elter 93/1-119.

Tab. 21: Kartierte Strukturgene auf der Kopplungskarte 94/1. In rote sind die Ethylenprimer, in blau Primer zur TxE-Karte und in grün Primer für den Si-Locus dargestellt.

Primerbezeichnung	Kopplungsgruppe 93/1-117	Kopplungsgruppe 93/1-119
RhACS1	2 x Koppl. Gruppe 1	Koppl. Gruppe 1
RhACS2	--	Koppl. Gruppe 7
RhACS3 und 3b	2 x Koppl. Gruppe 2	--
RhACS4	--	Koppl. Gruppe 2
RhACS5	--	Koppl. Gruppe 2
RhCTR1	Koppl. Gruppe 2 und 3	Koppl. Gruppe 2
RhCTR2	--	Koppl. Gruppe 3
RhETR2	Koppl. Gruppe 2	2 x Koppl. Gruppe 2
RhETR3	--	Koppl. Gruppe 4
RhETR4	Koppl. Gruppe 1	--
TE3	Koppl. Gruppe 3	Koppl. Gruppe 3
TE4	Koppl. Gruppe 3	Koppl. Gruppe 3
TE5	--	Koppl. Gruppe 4
TE10	2 x Koppl. Gruppe 5	Koppl. Gruppe 5
TE16	--	Koppl. Gruppe 3
TE21+23	Koppl. Gruppe 3	Koppl. Gruppe 3
TE22	2 x Koppl. Gruppe 3	2 x Koppl. Gruppe 3
TE28	--	Koppl. Gruppe 4
TE39	Koppl. Gruppe 6	Koppl. Gruppe 6
SFB	--	Koppl. Gruppe 3
BAC65F	--	Koppl. Gruppe 3
Kreuzung	--	Koppl. Gruppe 3
SFB1289	--	Koppl. Gruppe 3
SFB1213	--	Koppl. Gruppe 1 und 4

Von der TxE-Referenzkarte wurden sieben Sequenzen in der Kopplungskarte 94/1 kartiert. Alle Sequenzen sind auf der TxE Karte gemeinsam auf einer Kopplungsgruppe lokalisiert, auf der auch der Si-Locus lokalisiert ist. In der Kopplungskarte der Population 94/1 kartieren die Sequenzen der Primerpaare TE3, TE4, TE16, TE21+23 und TE22 auf der Kopplungsgruppe drei, auf der auch der Si-Locus vermutet wird. Die Primer TE3 und TE16, sowie TE22 und TE21+23 amplifizierten dieselbe Sequenz, dennoch liegen sie nicht exakt auf demselben Locus (*Abb. 50*). Die Sequenzen der Primer TE5, TE28 und TE39 kartieren nicht auf der Si-Kopplungsgruppe, sondern auf den Kopplungsgruppen vier und sechs.

Von den Si-relevanten Sequenzen (*Tab. 21* in grün) kartieren SFB, BAC65F, Kreuzung und SFB1289 auf der Kopplungsgruppe drei, auf der nach Kartierung des Merkmals Blütenfüllung der Si-Locus vermutet wird. SFB1213 kartiert auf den Kopplungsgruppe eins und vier. Die Primerpaare SFB1213 und 1289 wurden auf der Basis von dem durch RACE und Genome Walking verlängerten Amplifikat des Primerpaares Si15 erstellt, allerdings wurde die von ihnen amplifizierte Sequenz nicht überprüft.

Die Kopplungsgruppe drei zeigt eine Besonderheit in der Aufspaltung ihrer Marker und einige sind in der Tabelle 22 zur näheren Untersuchung aufgelistet.

Sequenzen, die dominant aa x ab ausgewertet wurden, weisen keine erkennbare Besonderheit auf. Anders sieht es bei Spaltungen vom Typ ab x ab und ab x ac aus. Im ersten Fall, sollten in der Nachkommenschaft die Allele aa, ab und bb vorkommen. Im Falle der Primerpaare SFB1213 und TE22 fehlt die Allelkombination bb in der Nachkommenschaft.

Bei der Spaltung ab x ac sollten die Allelkombinationen aa, ab, ac und bc vorkommen. tatsächlich sind im Falle der Mikrosatelliten Rh50 und Rh58 (Pop. 94/1) alle Allelkombinationen vorhanden, allerdings sind die Allelkombinationen aa und ac in der Nachkommenschaft wesentlich geringer vertreten. Der χ^2 -Wert für die 1:1:1:1 Spaltung ist daher für diese Marker auch entsprechend hoch (Tab. 22).

Die kartierten TE3 und TE4-Sequenzen (Pop. 94/1) und die untersuchten Kreuzungen zeigen weder die Allelkombination aa noch ac in der Nachkommenschaft.

Tab. 22: Spaltungsanalyse der Si-Kopplungsgruppen der Populationen 94/1 und 97/7. In den roten Kästchen sind die Besonderheiten der Aufspaltung in der Nähe des Si-Locus hervorgehoben. TE3 und TE4, sowie die Kreuzungsanalyse (Pop. 94/1) zeigen weder die Allele aa noch ac in der Nachkommenschaft und werden daher am Si-Locus lokalisiert sein, da durch das gametophytische System im Griffel bestimmte Allele nicht zur Keimung gelangen. Auch in der Population 97/7 sind bestimmte Allelkombinationen des Mikrosatelliten Rh58 geringer in der Nachkommenschaft vertreten, bzw. werden bei TE3 komplett ausgeschlossen. Bei der Spaltung aa x ab sind keine Besonderheiten in der Allelverteilung zu erkennen.

Bezeichnung	Spaltung	aa	ab	ac	bb	bc	χ^2
Pop. 94/1							
Rh50	ab x ac	5	10	39	--	37	38,81
Rh58	ab x ac	3	10	42	--	37	45,98
TE3	ab x ac	--	--	38	--	40	65,98
TE4	ab x ac	--	--	40	--	48	79,54
Kreuzung	ab x ac	--	--	28	--	24	26,6
SFB	aa x ab	50	41	--	--	--	1,46
BAC65F8	aa x ab	49	41	--	--	--	1,46
SFB1289	aa x ab	25	67	--	--	--	18,32
SFB1213_1	ab x ab	39	47	--	--	--	33,08
SFB1213_2	ab x ab	43	45	--	--	--	38,62
TE22_1	ab x ab	41	46	--	--	--	35,67
TE22_2	ab x ab	27	48	--	--	--	24,99
Te21u23	ab x ab	20	54	--	15	--	5,17
TE16	aa x ab	48	38	--	--	--	2,72
Pop. 97/7							
Rh50	aa x ab	75	90	--	--	--	2,03
Rh58	ab x ac	60	84	20	--	5	93,28
TE3	ab x ab	--	89	--	76	--	1,1

Diese Beobachtung ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass sich der Si-Locus der untersuchten Population auf der Kopplungsgruppe drei, mit Nähe zu den Mikrosatelliten Rh50 und Rh58 mit enger Kopplung zu TE3 und TE4 befindet.

Auch die Si-Kopplungsgruppe der Population 97/7 zeigt für den Mikrosatelliten Rh58 eine Verschiebung für bestimmte Allelkombinationen (ac und bc). Die TE3-Sequenz spaltet ab x ab und sollte in der Nachkommenschaft die Allelkombinationen aa, ab und bb aufweisen. Die Allelkombination aa ist in der Nachkommenschaft nicht vertreten und die TE3-Sequenz zeigt ebenso wie in der Population 94/1 eine Kopplung zu den Mikrosatelliten Rh50 und Rh58 und ist ein Hinweis auf den Locus der Si-Komponenten in der Population 97/7.

4.4 Erweiterung der Rosenkopplungskarte 97/7

Außer den im vorigen Abschnitt besprochenen Mikrosatelliten Rh50 und Rh58, sowie TE3, sind in der Population 97/7 noch zwei weitere Mikrosatelliten Rh73 und Rh59 kartiert worden. Für die Mikrosatelliten Rh50, Rh58 und Rh73 wurde jeweils ein Locus detektiert, während für Rh59 drei Loci (95/13-39) bzw. vier Loci (Spalier3) auf unterschiedlichen Kopplungsgruppen analysiert wurden. Als Beispiel für die ersten drei Mikrosatelliten wird nachfolgend ein Ausschnitt aus einem Mikrosatelliten-Gel von Rh58 mit der entsprechenden Zuordnung der Allele gezeigt (Abb. 51).

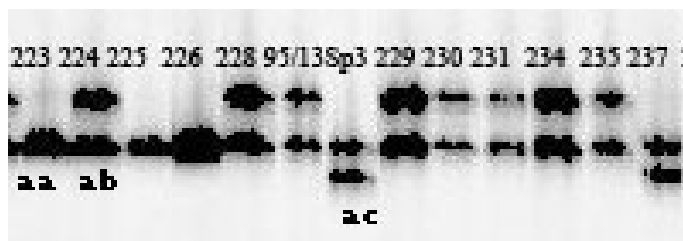


Abb. 51: Ausschnitt aus dem Mikrosatelliten-Gel von Rh58. Die Mutterpflanze 95/13-39 und der Großelter Spalier 3 wurden mehrfach auf den Mikrosatelliten-Gelen aufgetragen. Die Einteilung der Allele steht als Beispiel jeweils unter den drei Genotypen 223, 224 und Sp3.

Die Kopplungsgruppen, auf denen die Mikrosatelliten und TE3 kartiert wurden, sind in der Abbildung 52 für die Mutterpflanze 95/13-39 und in der Abbildung 53 für Spalier 3 dargestellt und ihre Aufspaltung (Tab. 22) wurde im vorherigen Kapitel ausführlicher besprochen.

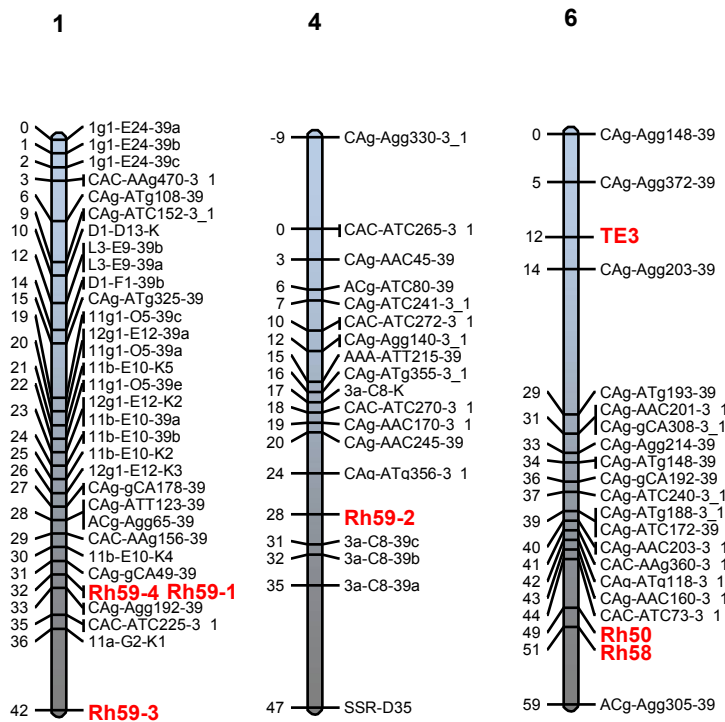


Abb. 52: Kopplungsgruppen der Mutterpflanze 95/13-39 der Population 97/7 auf denen die Mikrosatelliten und der Locus für TE3 kartiert wurden. Für Rh50 und Rh58 wurde jeweils ein Locus und für den Mikrosatelliten Rh59 wurden drei Loci kartiert.

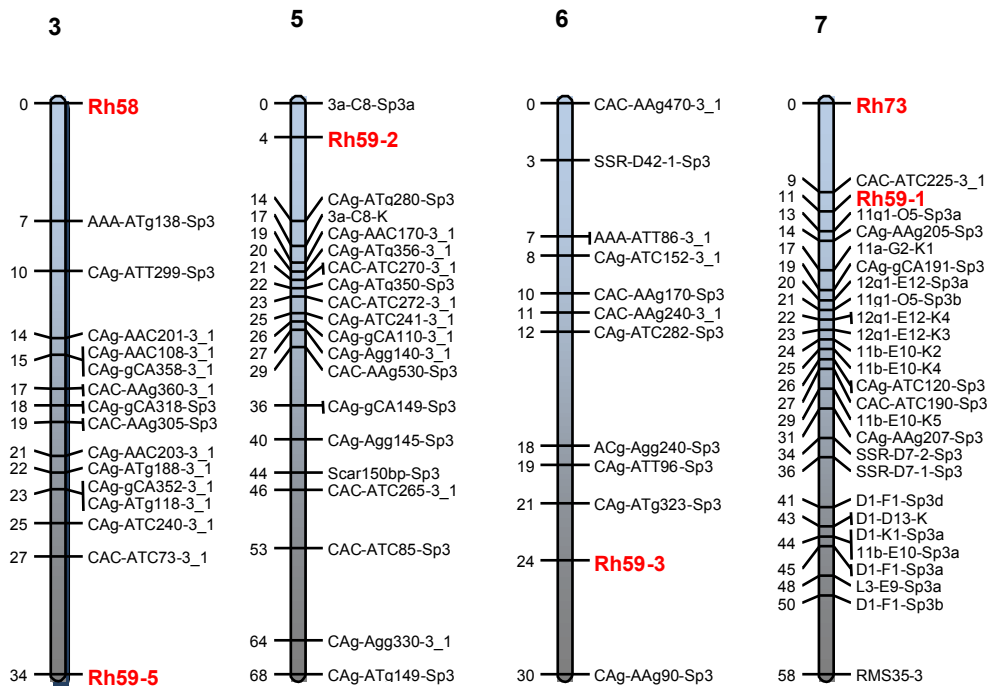


Abb. 53: Kopplungsgruppen von Spalier3. Es konnten die Mikrosatelliten Rh58, Rh59 und Rh73 (in rot) kartiert werden. Für Rh59 wurden 4 Loci auf unterschiedlichen Kopplungsgruppen detektiert.

Es wurden die Mikrosatelliten Rh58, Rh59, Rh73 und die Sequenz des Primerpaares TE3 für die Population 97/7 kartiert.

5. Diskussion

5.1 Ethylenempfindlichkeit

Die Haltbarkeit von Rosen, insbesondere von Schnittrosen ist von großem wirtschaftlichem Interesse. Aus diesem Grund wurden bereits Untersuchungen zur Haltbarkeit, die vor allem von der Reaktion auf das Phytohormon Ethylen beeinflusst wird, durchgeführt (JOHNSON & ECKER, 1998; MA et al., 2005). Ethylen beeinflusst viele Stoffwechselfvorgänge, wobei die Reifung der Früchte und das Verwelken der Blüten im wirtschaftlichem Vordergrund steht.

Verschiedene Pflanzen, darunter auch die Modell-Pflanze *Arabidopsis thaliana* wurden bisher im Hinblick auf ihren Ethylenstoffwechsel und Haltbarkeit untersucht. Auch Rosen, insbesondere Topfrosen wurden auf stress-induzierte Ethylenproduktion, Ethylenrezeptoren und exprimierte Gene des Ethylenstoffwechsels untersucht (MÜLLER et al., 1998, 2000a, 2000b). Exogenes Ethylen löste dabei einen Anstieg der Konzentration an ACC-Synthase und ACC-Oxidase aus. Beides sind Enzyme aus dem Yang-Zyklus und damit dem Biosynthesestoffwechsel von Ethylen.

Außer dem Verwelken der Blüten, reagieren Rosen auch mit dem Abwurf ihrer Fiederblätter auf das Phytohormon Ethylen, obgleich noch nicht klar ist, ob für das Verwelken dieselben Gene verantwortlich sind wie für den Abwurf der Fiederblätter. Der Abwurf der Fiederblätter wurde in dieser Arbeit dazu verwendet die Ethylenempfindlichkeit einiger Individuen der Population 94/1 und ihrer Elternpflanzen zu untersuchen und anschließend einer QTL-Analyse zu unterziehen. Hierzu wurde der Abwurf der Fiederblätter ab dem dritten bis zum sechsten Tag nach Ethylenbegasung von ca. 80 Individuen verglichen.

Ab dem dritten Tag begannen einige Blätter ihre Fiederblätter abzuwerfen. Der Abwurf der Fiederblätter nahm in den darauffolgenden Tagen zu und die innerhalb der Population unterschiedlich stark ausgeprägte Reaktion auf das Phytohormon Ethylen wurde erkennbar. Nach sechs Tagen zeigt die Häufigkeitsverteilung zu dem für die Messung der Ethylenempfindlichkeit herangezogenen Merkmal des Blattabwurfs nahezu eine Normalverteilung. Die Individuen der Population 94/1 und die Elternpflanzen 93/1-117 und -119 zeigten demnach eine messbar unterschiedlich stark ausgeprägte Reaktion auf das Phytohormon Ethylen. Der Genotyp 93/1-119 zeigte sich als länger haltbar im Vergleich zum Genotyp 93/1-117.

Für die Kartierung der untersuchten Reaktion auf das Phytohormon Ethylen wurde das Programm MapQTL herangezogen. Mit dem Permutationstest wurde der Schwellenwert ermittelt, ab dem ein QTL-Signal signifikant ist. Anschließend wurde ein Kruskal-Wallis-Test durchgeführt um sicherzustellen, dass es sich nicht um ein zufälliges Signal handelt. Dies kann mit dem Ergebnis von $H=0$ des Kruskal-Wallis Tests für die QTL-Signale sicher ausgeschlossen werden.

Das Ergebnis der QTL-Analyse sind unterschiedliche Signale für die unterschiedlichen Begasungsdauern mit Ethylen. Zur besseren Übersicht sind sie nachfolgend tabellarisch aufgelistet.

Tab. 23: QTL-Analyse. Kopplungsgruppen der Genotypen 93/1-117 und -119 denen QTL-Signale nach vier bis sechs Tagen Ethylenbegasung zugeordnet werden konnten. Die genauere Lage der QTLs auf den Kopplungsgruppen ist im Abschnitt *Ergebnisse* unter 4.1.2 *QTL-Analyse* dargestellt.

Dauer der Etylenbegasung	Genotyp 93/1-117	Genotyp 93/1-119
vier Tage	Kopplungsgruppe 6	Kopplungsgruppe 6 Kopplungsgruppe 7
fünf Tage	--	--
sechs Tage	Kopplungsgruppe 3	Kopplungsgruppe 3 Kopplungsgruppe 5

Beide Genotypen zeigen nach vier bzw. nach sechs Tagen auf jeweils einer gemeinsamen Kopplungsgruppe ein QTL-Signal. Unter 4.1.2 *QTL-Analyse* wird die genaue Lage der QTLs dargestellt. Sie zeigen sich in annähernd dem gleichen Bereich von molekularen Markern, wie z.B. für die Kopplungsgruppe sechs im Bereich des Markers E35M50-229. Das ist ein Hinweis darauf, dass für die QTLs die gleichen Gene exprimiert werden.

Die Signale nach sechs Tagen haben sich vom vierten Tag an langsam verstärkt bis sie den Schwellenwert überschritten. Die QTLs zeigen sich auf der Kopplungsgruppe drei. Auch hier sind sie auf beiden Kopplungskarten der Eltern 93/1-117 und 93/1-119 im selben Bereich kartiert worden und liegen in der Region des Markers TE21u23.

Auch für den Locus des Strukturgens RhCTR2 auf der Kopplungsgruppe drei zeigt sich ein kleiner Anstieg im Verlauf der QTL-Kurve, der allerdings auch nicht den Schwellenwert übersteigt. Dieser Anstieg zeigt sich deutlich für den Genotyp 93/1-117, bei dem Genotyp 93/1-119 tritt er etwas verschobener auf und hat eventuell keinen Bezug zum RhCTR2-Locus. CTR ist entscheidend bei der Weiterleitung des Signals für eine vorhandene Bindung von Ethylen an einen Rezeptor. Liegt keine Bindung vor, so sind die cytoplasmatischen Rezeptoren aktiviert und verhindern eine Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die eine

Ethylenantwort auslösen würden. Eine Insensitivität gegenüber dem Phytohormon Ethylen wäre daher eher bei den Ethylenrezeptoren zu erwarten.

Zusätzlich zeigt der Genotyp 93/1-119 jeweils am Tag vier und sechs ein Signal auf einer weiteren Kopplungsgruppe. Der Genotyp 93/1-119 zeigte sich in den Basungsversuchen als resistenter gegenüber dem Phytohormon Ethylen als der Genotyp 93/1-117. Weitere Untersuchungen der Kopplungsgruppen sieben und fünf könnten daher Aufschluß darüber geben, ob in den zusätzlichen QTL-Signalen des Genotyps 93/1-119 die längere Haltbarkeit begründet liegt.

Bisherige Untersuchungen zur Ethylenempfindlichkeit haben ergeben, dass eine Ethylenbegasung einen Anstieg der Konzentrationen der Enzyme ACC-Synthase (ACS) und ACC-Oxidase zur Folge hat. Das Strukturgen RhACS2 wurde auf der Kopplungsgruppe sieben kartiert, welche nach vier Tagen Ethylenbegasung für den Genotyp 93/1-119 ein QTL-Signal zeigt. Die QTL-Kurve zeigt bei RhACS2 einen kleinen Ausschlag, der deutlich höher liegt als die übrige Kurve (abgesehen vom zuvor beschriebenen QTL-Signal), aber den durch den Permutationstest ermittelten Schwellenwert nicht übersteigt.

Die QTL-Kurve auf der Kopplungsgruppe sieben zeigt bei dem Locus für RhETR2 einen kleinen Einbruch für den Genotyp 93/1-117. Dieser Einbruch zeigt sich nach allen untersuchten Begasungsdauern von vier bis sechs Tagen.

Durch die QTL-Analyse wurden sowohl Gemeinsamkeiten (QTLs auf den Kopplungsgruppen drei und sechs) als auch deutliche Unterschiede (QTLs auf den Kopplungsgruppen sieben und fünf für den Genotyp 93/1-119) zwischen den Genotypen 93/1-117 und 93/1-119 dargestellt.

Für Forschungen zur Haltbarkeit von Rosen können die ermittelten QTLs einen Hinweis auf die Loci der beteiligten Gene geben. Entwicklungen von molekularen Markern zur Haltbarkeit von Rosen können im Rahmen von markergestützter Selektion Züchtern die Möglichkeit zu einer früheren Selektion innerhalb ihrer Nachzuchten dienen und auch ein gezieltes Klonieren von erwünschten Genen ermöglichen. Die ermittelten QTLs beziehen sich auf die Haltbarkeit von Blättern und nach Verifizierung der Ergebnisse in anderen diploiden und tetraploiden Populationen wäre eine weitere Analyse der Haltbarkeit von Blüten sinnvoll. Die Haltbarkeit von Blättern sind aber auch von wirtschaftlichem Interessen, da sie z.B. auch bei Krankheitsbefall der Pflanze eine Rolle spielen können.

Für eine weitere Analyse der Ethylenempfindlichkeit von Rosen wurden Strukturgene zur Ethylenbiosynthese und Ethylenerkennung kartiert, die z.T. im vorherigen Abschnitt bereits im Zusammenhang mit den QTLs genannt wurden.

Die amplifizierten Sequenzen wurden sowohl einer BLAST-Untersuchung in NCBI unterzogen als auch einem Alignment mit bekannten Sequenzen aus NCBI in Bioedit. Es konnte jeweils die Zugehörigkeit der Sequenz zum jeweiligen Gen bestätigt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden acht Loci für ACC Synthasen, fünf Loci für Ethylenrezeptoren und vier Loci für CTR auf den Kopplungsgruppen der Elternpflanzen 93/1-117 und -119 kartiert. Strukturgene, welche bei beiden Eltern kartiert werden konnten, sind auf den jeweils gleichen Kopplungsgruppen lokalisiert. Die meisten Strukturgene wurden auf der Kopplungsgruppe zwei kartiert.

Eine Vielzahl von Stoffwechselfvorgängen beeinflussen die Haltbarkeit von Rosen und in dieser Arbeit ist nur eine Auswahl an Strukturgenen zum Ethylenstoffwechsel kartiert worden, daher ist es wahrscheinlich, dass sich die QTL-Signale auf Komponenten beziehen, die in dieser Arbeit nicht berücksichtigt worden bzw. noch nicht bekannt sind. Hinweise auf eine Beteiligung von RhETR2, RhACS2 und RhCTR2 an der Haltbarkeit von Rosen konnten gezeigt werden. Weitere Untersuchungen hierzu könnten die Entwicklung von molekularen Markern zur Haltbarkeit ergeben, mit denen es Rosenzüchtern durch markergestützte Selektion möglich wäre schon im Vorfeld längere Zeit haltbare Rosensorten zu selektieren.

5.2 Selbstinkompatibilität

Ein gametophytisches Selbstinkompatibilitätssystem wird schon seit einiger Zeit für Rosen vermutet (RATSEK et al., 1940, COLE & MELTON, 1986) und ist für einige Rosaceae, z.B. *Prunus* bereits gut untersucht. Für *Prunus* sind bereits >50 RNasen- und 10 SFBs- Sequenzen bekannt. Obwohl Rosen zu den fünf bedeutendsten Zierpflanzen gehören, ist noch keine RNase- oder SFB-Sequenz bekannt und damit das gametophytische Selbstinkompatibilitätssystem für Rosen noch nicht belegt. Der Hauptgrund wird darin liegen, dass die Kulturrosen im Gegensatz zu Wildrosen meist tetraploid sind und das gametophytische Selbstinkompatibilitätssystem nur bei diploiden Rosen ausgeprägt wird (RAJAPAKSE et al., 2001).

Für *Prunus* sind sowohl selbstkompatible wie auch selbstinkompatible Arten bekannt und das GSI-System greift auch bei tetraploiden Pflanzen. LANSARI & IEZZONI (1990) untersuchten Sauerkirschen, die sowohl selbstkompatible wie auch inkompatible Pflanzen aufwiesen und fanden heraus, dass es sich nicht um einen generellen Zusammenbruch des Selbstinkompatibilitätssystem bei Tetraploidie handelt, sondern um eine genetische Änderung der Si-Komponenten (S-RNase und SFB) durch Mutation.

Bei Solanaceae bricht das Selbstinkompatibilitätssystem bei Tetraploidie zusammen und die Pflanzen sind selbstkompatibel. CHARLESWORTH et al. (2005) erklärten den Zusammenbruch mit kompetitiver Inhibition durch jeweils zwei verschiedene SLF-Proteine (Pollenkomponente), die alle vorhandenen S-RNasen binden (siehe auch 1.3.2.4 *GSI-Modelle*).

Tetraploide Rosen sind wie Solanaceae selbstkompatibel. Es konnte anhand mehrfacher unabhängiger Regenerate des Genotyps 88/124-46 durch Colchicin-Behandlung gezeigt werden, dass eine diploide selbstinkompatible Rose mit tetraploiden Genom selbstkompatibel wird.

Sequenzvergleiche der Si-Komponenten von Rosen mit homologen Sequenzen von Solanaceae und Prunoideae könnten es ermöglichen das GSI-System von Rosen entsprechend zuzuordnen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Si-System der diploiden Rosenpopulation 94/1 untersucht. Dazu wurden Kreuzungsanalysen und genetische Untersuchungen der Si-Komponenten durchgeführt.

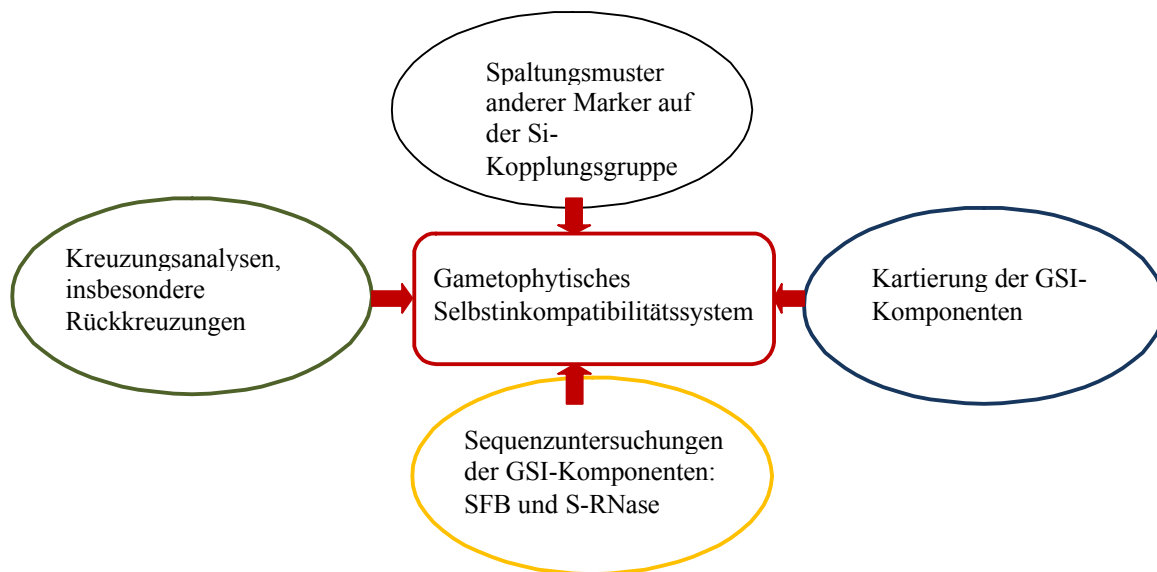


Abb. 54: Übersicht über die Untersuchung des GSI-Systems in Rosen

Kreuzungen von Rosenpopulationen am IZZ in Ahrensburg und am Institut für Pflanzengenetik der Leibniz Universität Hannover haben für die diploiden Rosenpopulation 94/1 (ca. 100 Individuen) eine 1:1 Spaltung für das Merkmal Blütenfüllung ergeben. Die reziproken Kreuzungspopulationen 95/18 (ca. 20 Individuen), 99/16 (ca. 100 Individuen) und 99/17 (ca. 200 Individuen) zeigen dagegen fast ausschließlich gefüllte Blüten. Normalerweise sollte das Merkmal Blütenfüllung 1:1 spalten, unabhängig davon welche der Elterpflanzen als Mutterpflanze oder Pollenspender eingesetzt wird. Mit einem Si-System wäre die unterschiedliche Aufspaltung erklärbar, da Merkmale, die in der Nähe des Si-Locus lokalisiert sind, ebenfalls durch das Si-System bei der Vererbung beeinflusst werden (4.2 *Selbstinkompatibilität*). Das liegt daran, dass es durch das Si-System zu einem Allelausschluss kommt, wenn sich die Allele der Elternpflanzen gleichen und damit auch benachbarte Allele der gleichen Kopplungsgruppe betroffen sind. In der Kreuzung 119 x 117 (ab x ac) wird bei GSI das a-Allel des Elters 117 ausgeschlossen und die Nachkommen weisen die Genotypen ac und bc auf. Bei der reziproken Kreuzung ac x ab wird das a-Allel des Elters 119 ausgeschlossen und die Nachkommen weisen die Genotypen ab und bc auf. Das Merkmal Blütenfüllung wurde auf der Kopplungsgruppe drei kartiert. Aufgrund der ungewöhnlichen Aufspaltung wurde angenommen, dass sich auch der Si-Locus auf dieser Kopplungsgruppe befindet.

Wenn das der Fall ist, dann müssten auch andere Marker auf der Kopplungsgruppe drei ein verschobenes Spaltungsverhältnis zeigen. Das konnten für die Mikrosatelliten Rh50 und Rh58 gezeigt werden, deren verschobenes Spaltungsverhältnis an dem hohen χ^2 -Werten von 38,81

und 45,98 (4.3 Rosenkopplungskarte, Tab. 21) deutlich wird. Die Kreuzung ab x ac führt zwar in der Nachkommenschaft zu allen erwarteten Genotypen, aber nicht im Verhältnis 1:1:1:1, sondern das Spaltungsverhältnis ist deutlich zugunsten der Genotypen ac und bc in der Nachkommenschaft verschoben. Die Mikrosatelliten Rh5 und Rh58 zeigt auch in der Population 97/7 ein verschobenes Spaltungsverhältnis.

Zur weiteren Untersuchung, ob in Rosen ein Selbstinkompatibilitätssystem existiert, wurden Rückkreuzungen vorgenommen. Nach einer theoretischen Vorüberlegung (4.2 Selbstinkompatibilität) werden nach Kreuzung der Halbgeschwister 93/1-119 und 93/1-117 (ab x ac) drei verschiedene Si-Allele vererbt. Dabei wird das gemeinsame Allel zwischen den Kreuzungseltern durch das GSI System nur durch die Mutterpflanze vererbt, da ein Pollen mit dem gleichen Allel durch S-RNasen an der Befruchtung gehindert wird. In der Nachkommenschaft kommen also nur die Allelkombinationen ac und bc vor, während die Allelkombinationen aa und ab fehlen (4.2 Selbstinkompatibilität). Werden nun Individuen der Population 94/1 mit einem Elter gekreuzt, dann wird aufgrund des GSI-Systems nur der Genotyp bc mit dem Elter 93/1-117 zu einem Fruchtansatz führen. Kreuzungen mit dem Elter 93/1-119 führt bei allen Nachkommen zum Fruchtansatz. Die Kreuzungsergebnisse mit 67 Individuen der Population 94/1 sind in der Tabelle 13 unter 4.2.1 Kreuzungsdaten dargestellt. Demnach führt die Kreuzung eines Nachkommen mit dem Elter 93/1-117 in 36 Fällen zum Fruchtansatz und in 31 Fällen kommt es zu keinem Fruchtansatz. Die Kreuzungen mit dem Elter 93/1-119 führte immer zu einem Fruchtansatz. Da es sich bei den Kreuzungseltern um Halbgeschwister handelte, kann eine zytoplasmatische Komponente ausgeschlossen werden, da dieses bei beiden Eltern identisch ist. Die Rückkreuzungen belegen das Vorhandensein eines Gametophytischen Selbstinkompatibilitätssystem in Rosen. Das Merkmal wurde auf der Kopplungsgruppe drei kartiert, auf der auch das Merkmal Blütenfüllung und die Mikrosatelliten Rh5 und Rh58 kartiert worden sind.

Die Kopplungsgruppe drei von *Rosa* wurde mit der Si-Kopplungsgruppe von *Prunus* verglichen. Aufgrund der Syntänie zwischen *Prunus* und *Rosa* wurden auch *Prunus*-Sequenzen aus der Referenzkarte TxE (4.2.2.1 *Texas x Earlygold*) von der Si-Kopplungsgruppe in Rosen kartiert. Die Marker TE3 und TE4, die auf der Referenzkarte ohne Rekombination zum Si-Locus kartieren, zeigen im SSCP-Gel für die Population 94/1 bei dem Elter 93/1-117 eine Bande (c-Allel), die in der Nachkommenschaft nicht aufspaltet, während die reziproke Kreuzung für den Elter 93/1-119 eine Bande (b-Allel) zeigt, die in der Nachkommenschaft nicht aufspaltet. Ohne ein Si-System hätten die SSCP-Gele der Nachkommenschaften 94/1 (93/1-119 x 93/1-117) und 95/18 (93/1-117 x 93/1-119)

identische Bandenmuster zeigen müssen. Entsprechend ihres verschobenen Spaltungsmuster, welches sich auch in ihren x^2 -Werten, $TE3 = 65,98$ und $TE4 = 79,54$, zeigt.

Die theoretische Allelverteilung bei GSI und das unterschiedliche Bandenmuster der beiden Populationen in der SSCP-Analyse (Abb. 37 unter 4.2.2.1 *Texas x Earlygold*) erlaubt eine Zuordnung der Allele zu bestimmten Banden im SSCP-Gel. Die daraus resultierende ab x ac Spaltung zeigt, wie für ein GSI-System zu erwarten, einen Ausschluß der Allelkombinationen aa und ab. TE3 und TE4 wurden auf der Kopplungsgruppe drei kartiert, auf der auch der durch die Rückkreuzungen ermittelte Si-Locus und das Merkmal Blütenfüllung kartiert worden ist.

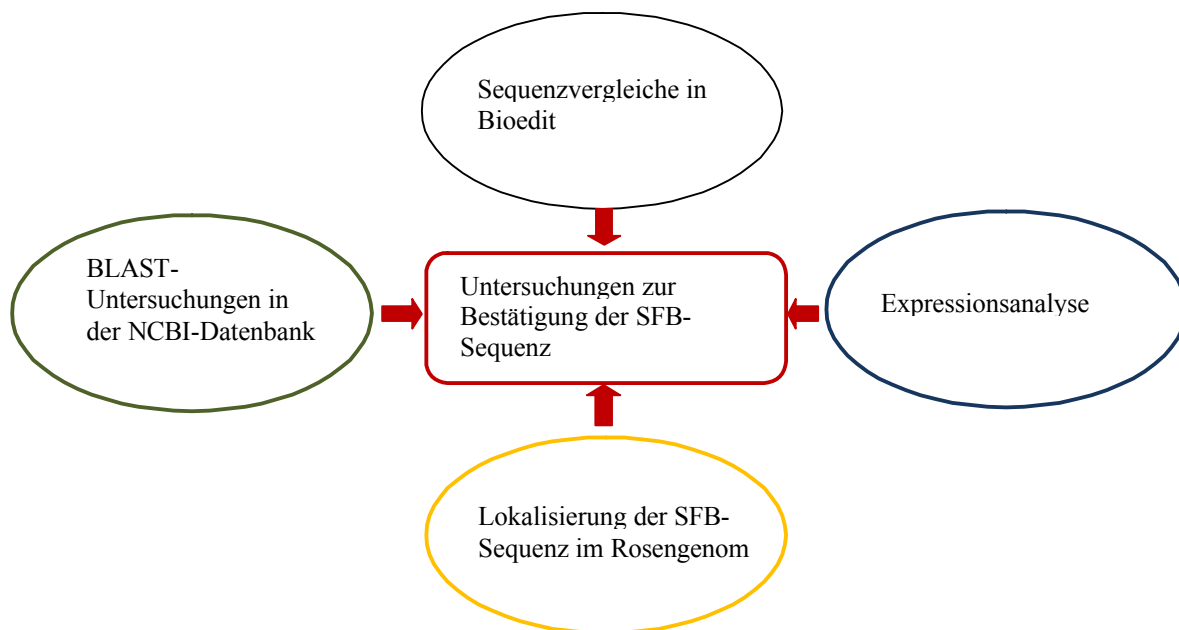


Abb. 55: Untersuchungen zur Bestätigung der SFB-Sequenz

Für weitere Hinweise auf ein gametophytisches Selbstinkompatibilitätssystem in Rosen, wurden genetische Untersuchungen zur GSI-Komponenten SFB mittels dem Primerpaar Si15 (ROMERO et al., 2004) und den aus der amplifizierten Sequenz entwickelten Primerpaar SFB2+2 durchgeführt. Die durch das Primerpaar Si15 amplifizierte Sequenz wurde zunächst einer BLAST-Untersuchung in NCBI unterzogen und ergab ausschließlich Übereinstimmungen mit *Prunus* SFB-Sequenzen (Abb. 35 unter 4.2.2 *Molekularbiologische Untersuchung des Si-Locus in Rosen*).

Auch ein Sequenzvergleich in Bioedit von Si15 amplifizierten Sequenzen mit *Prunus* SFB-Sequenzen ergab eine hohe Übereinstimmung (Abb. 36 unter 4.2.2 *Molekularbiologische Untersuchung des Si-Locus in Rosen*). Im Gegensatz zur *Prunus*-SFB-Sequenz enthalten die mit dem Primerpaar Si15 amplifizierten Sequenzen in Rosen zwei Introns. Wenn es sich bei

den amplifizierten Sequenzen um die SFB-Sequenz handelt, dann ist das ein weiterer Hinweis darauf, dass sich die Si-Systeme von Prunus und Rosen unterscheiden, da bei Prunus auch das Si-System bei tetraploiden Arten intakt ist, während tetraploide Rosen selbstkompatibel sind.

Die Si15-Sequenzen sind bis auf wenige SNPs identisch. Die SNPs können auf verschiedene Haplotypen hinweisen, da auch zwischen *Prunus pseudoceratus*-SFB-Sequenzen mitunter nur wenige SNPs zu finden sind. Einen Hinweis darauf, ob es sich dabei um SNPs oder um Sequenzierungsfehler handelt, stellt die Wiederholung desselben SNP in verschiedenen Genotypen dar. Für die Untersuchung, ob die SNPs der verschiedenen Genotypen für verschiedene Allele stehen, wurde die DNA-Sequenz auf der Website von EMBL EMBOSS auf Proteinebene analysiert. Nach der Translation zeigte sich, dass sich die meisten SNPs auf die Proteinstruktur auswirken und es sich bei den SFB-Sequenzen um verschiedene Allele handelt.

Nach BLAST-Untersuchungen und Sequenzvergleiche wurde auch eine Expressionsanalyse durchgeführt. Hierzu wurde die Expression der von dem Primerpaar Si15 amplifizierten Sequenz in Antheren, Griffeln, Blättern und Petalen verglichen. Es wurde eine Expression in Antheren bestätigt, in den übrigen Geweben konnte keine Expression bestätigt werden. Demnach wird die von dem Primerpaar Si15 amplifizierte Sequenz ausschließlich in Antheren exprimiert. Die Positiv-Kontrolle bestand aus genomischer DNA. Die PCR mit genomischer DNA zeigt, da Introns mit eingeschlossen sind, wie erwartet ein größeres Amplifikat. Auf diese Weise kann auch sicher ausgeschlossen werden, dass das Amplifikat aus der PCR mit cDNA von Antheren aus noch aus der RNA-Isolation vorhandener genomischer DNA besteht. Diese Beobachtung zeigt, dass es sich bei der untersuchten Sequenz um die SFB-Sequenz handeln kann.

Das Amplifikat des Primerpaares Si15 wurde mittels RACE und GenomicWalking verlängert um die vollständige SFB-Sequenz zu ermitteln. Da das Primerpaar Si15 (ROMERO et al., 2004) zu keinen Polymorphismen in der Nachkommenschaft führte, wurden neue Primerpaare erstellt und mit dem Primerpaar SFB2+2 (*Abb. 38* unter *4.2.2 Molekularbiologische Untersuchung des Si-Locus in Rosen*), welches die Intronregionen umspannt, konnte die Sequenz im Rosengenom lokalisiert werden. Der SFB-Marker wurde auf der Kopplungsgruppe drei kartiert, auf der auch die TE3 und TE4 Sequenzen, das Merkmal Blütenfüllung, der durch Rückkreuzungen ermittelte Si-Locus und die Mikrosatelliten Rh50 und Rh58 kartiert worden sind.

Die SFB-Sequenz wurde zwar auf derselben Kopplungsgruppe wie der Si-Locus kartiert, weist aber 35 Rekombinationen zu diesem auf. Das kann daran liegen, dass das GSI-System in Rosen nicht zu 100% greift und damit die Rückkreuzungsdaten beeinflusst wurden.

Eine weitere Erklärung für die Rekombinationen zwischen dem kartierten Si-Locus und der Pollenkomponente sind Fehler in der Analyse der SFB-Spaltung, die durch Vertauschungen von Genotypen entstanden sein könnten. Aus diesem Grund wurden Wiederholungen mit verschiedenen DNA-Pools durchgeführt.

Auch muß die Möglichkeit bedacht werden, dass es sich nicht um die Pollenkomponente des Si-Systems handelt, sondern um eine Kopie des SFB-Gens. SASSA et al. (2007) sequenzierten 317kb des S-Locus von *Malus domestica* und *Pyrus pyrifolia* und fanden dabei mehrere Kopien des SFB-Gens im Bereich des S-RNase-Gens, die alle spezifisch im Pollen exprimiert wurden. Sollte es sich um eine SFB-Kopie handeln, so würde der Marker nicht genau am S-Locus kartieren, sondern nur in unmittelbarer Nähe.

Vergleiche von S-RNase-DNA-Sequenzen von *Prunus* ergaben z.T. keine Übereinstimmungen untereinander und BLAST-Untersuchungen mit bekannten S-RNase-Sequenzen von *Prunus* und anderen Rosaceae ergaben keine Übereinstimmungen. Es sind erst wenige S-RNase-Sequenzen bekannt und diese unterscheiden sich so extrem, dass sie nicht mit BLAST-Analysen bei NCBI bestätigt werden können. Das erschwert die Analyse dieser Si-Komponente erheblich, denn ermittelte Sequenzen können nicht durch Vergleiche mit bekannten Sequenzen bestätigt werden.

Es wurden Sequenzen ermittelt, die durch die Primerpaare Si7, Si10b, Si14 und Si29 (TAO et al., 1999; ROMERO et al., 2004) amplifiziert wurden. Die Sequenzen zeigten keine Übereinstimmung zu bekannten S-RNase-Sequenzen verwandter Arten oder Übereinstimmungen im NCBI-BLAST. Wie zuvor besprochen, schließt dies aber nicht aus, dass es sich um S-RNase-Sequenzen handelt, da sie sehr variabel sind. Zwischen zwei Solanaceae-S-RNasen stimmte die Sequenz zu lediglich 38 % überein.

Es wurden PCRs mit BAC-Klon-DNAs (4.2.2.2 Untersuchungen zu Rosenhomologen zu Si-Genen anderer Rosaceae) durchgeführt, da ein S-RNase-Amplifikat nur dann möglich ist, wenn die amplifizierte Sequenz in der Nähe von der SFB-Sequenz lokalisiert ist. Im Falle einer S-RNase-Sequenz ist das zu vermuten, da die Si-Komponenten nicht durch Crossing over Ereignisse getrennt werden dürfen. Für die Primerpaare Si7, Si10b und Si14 wurden Amplifikate ermittelt. Dies wäre ein weiterer Hinweis, dass die Primerpaare Si7, Si10b und Si14 zur Amplifikation der S-RNase führen könnten.

Möglicherweise ist eine Proteinanalyse für die genetische Untersuchung der S-RNase hilfreicher. Es wurden im Rahmen dieser Arbeit auch erste Untersuchungen mittels 2-D-Gelelektrophorese von Griffelproteinen durchgeführt. Grundsätzlich ist es möglich Rosen-Griffelproteine elektrophoretisch aufzutrennen. Anschließende Isolation der einzelnen Spots und Sequenzierung könnte zur Ermittlung der Rosen-S-RNase führen.

Es ist außerdem möglich durch Genome Walking ausgehend von der SFB-Sequenz die benachbarten DNA-Sequenzen zu ermitteln und die Sequenzen auf Übereinstimmungen zu bekannten S-RNase-Sequenzen zu untersuchen.

Das Vorhandensein eines gametophytischen Selbstinkompatibilitätssystem in Rosen konnte durch Rückkreuzungen der Population 94/1 mit den Eltern 93/1-117 und 93/1-119 und durch genetische Untersuchung der Si-Komponente SFB belegt werden.

Für Untersuchungen zur Syntänie des S-Locus zwischen *Prunus* und *Rosa* wurden verschiedene Sequenzen von der TxE-Referenzkarte in der Kopplungskarte der Population 94/1 lokalisiert. Aufgrund von Syntänie zwischen verschiedenen Pflanzenarten, kann die Kartierung von Sequenzen, die in der Nähe des Si-Locus auf der TxE-Referenzkarte liegen, durch die Kartierung in der Pop. 94/1 einen weiteren Hinweis auf die Lokalisation des Si-Locus in Rosen geben. Aus diesem Grund wurden für die Erstellung von Primern EST-Sequenzen der Si-Kopplungsgruppe der TxE-Karte ausgesucht.

Die Referenzkarte TxE mit mehr als 560 Markern wurde auch für Syntänie-Untersuchungen zwischen anderen Arten verwendet und mit ihrer Hilfe wurden auch die Kopplungsgruppen von *Prunus* spp. zugeordnet (NISHITANI et al., 2007; DIRLEWANGER et al. 2004, LALLI et al., 2008, HOWAD et al., 2005). Drei TxE-Sequenzen (PP_LEa0009M17f = TE21+23 und TE22; PP_LEa0010K05f = TE3 und TE16; PP_LEa0013F14f = TE 4) kartieren in der Population 94/1 auf der Kopplungsgruppe drei, auf der der Si-Locus von Rosen kartiert wurde.

Die Sequenzen der TE-Primer TE5 (Kopplungsgruppe vier), TE10 (Kopplungsgruppe fünf), TE28 (Kopplungsgruppe vier) und TE39 (Kopplungsgruppe sechs) sind nicht auf der Si-Kopplungsgruppe lokalisiert. Die Rekombinationswahrscheinlichkeit nimmt häufig bei anderen Populationen zu, so dass es nicht ungewöhnlich ist, dass sie im Rosengenom nicht auf der Si-Kopplungsgruppe lokalisiert sind. Syntänieuntersuchungen von VILANOVA et al. (2008) zwischen *Prunus* und *Fragaria* ergab, dass nur zwei Kopplungsgruppen in der Anordnung der Gene identisch sind, während es bei sechs (*Prunus*) bzw. fünf (*Fragaria*) Kopplungsgruppen jeweils Bereiche gibt, die übereinstimmen, aber die nicht auf jeweils einer

Kopplungsgruppe zusammenhängend zu finden sind. Die Kopplungsgruppe sechs von *Prunus*, auf der sich der Si-Locus befindet, ist im *Fragaria*-Genom auf den Kopplungsgruppen eins und drei (VILANOVA et al., 2008).

Syntänie zwischen *Rosa* ($x = 7$) und *Prunus* ($x = 8$) konnte durch das Vorhandensein der jeweils homologen Sequenzen in *Rosa* und *Prunus* gezeigt werden. Drei EST-Sequenzen wurden bei *Rosa* auch auf der Si-Kopplungsgruppe kartiert. Die Sequenzen aus der TxE-Karte, die sich im oberen Bereich der Kopplungsgruppe sechs befinden, kartieren bei *Rosa* nicht auf der Kopplungsgruppe drei. Im Falle der vier EST-Sequenzen kann demnach von einer Neuordnung des oberen Bereichs der Si-Kopplungsgruppe von *Prunus* bei *Rosa* durch Translokation oder Fusion ausgegangen werden, die zwischen *Fragaria* und *Prunus* bereits belegt wurde (VILANOVA et al., 2008).

Die Kenntnisse zum S-Locus in Rosen sind für Züchter vorallem dann interessant, wenn es sich bei den Kreuzungseltern um diploide Rosen handelt. Bei den Kulturrosen handelt es sich allerdings um tetraploide Rosen. Anhand des CT-behandelten tetraploiden Genotyps 88/124-46 konnte gezeigt werden, dass das SFB-Gen nicht verloren gegangen ist, sondern das GSI-System aus anderen Gründen (kompetitive Interaktion?) nicht mehr funktionsfähig ist. Für weitere Forschungen in diesem Bereich wäre es interessant zu überprüfen, ob wirklich kein GSI-Einfluß bei tetraploiden besteht und warum tetraploide Rosen selbstkompatibel werden.

Desweiteren ist es für Populationsgenetische Untersuchungen interessant die Diversität der in Rosen vorhandenen Si-Allele mit anderen Rosenpopulationen in anderen Gebieten zu vergleichen, vorallem, da selten gewordene Si-Allele im Gegensatz zu anderen Allelen, durch das Si-System einen Vorteil bekommen. Außerdem können durch Vergleiche der Si-Allele mit anderen Arten Verwandtschaftsbeziehungen untersucht werden.

5.3 Erweiterung der Kopplungskarte 97/7

Mikrosatelliten bestehen aus einer variablen Anzahl von tandem repeats (VNTRs) und werden daher auch als simple sequence repeats (SSRs) oder simple tandem repeats (STR) bezeichnet. Ihre gleichmässige Verteilung im Genom macht sie zu nützlichen molekularen Markern bei der Kartierung von Chromosomen.

Die Kartierung der Mikrosatelliten ist für einen Vergleich der Karten der Pop. 94/1 und 97/7 wichtig, da sie eine Zuordnung der Kopplungsgruppen zwischen den beiden Kopplungskarten erlauben.

Da an das Merkmal Blütenfüllung die Mikrosatelliten Rh50 und Rh58 gekoppelt sind, wurden die Mikrosatelliten auch in der Kopplungskarte 97/7 lokalisiert. Sie geben zusammen mit TE3 und TE4 einen Anhaltspunkt auf welcher Kopplungsgruppe der Si-Locus in der Population 97/7 lokalisiert ist. Das Merkmal Blütenfüllung, die Mikrosatelliten Rh50 und Rh58, sowie TE3 und TE4 wurden der Kopplungsgruppe sechs zugeordnet.

Je mehr Marker auf den beiden Kopplungskarten 94/1 und 97/7 kartiert werden, desto genauer werden Voraussagen zur Lage von bestimmten EST-Sequenzen und die integrierte Karte kann bei der Entwicklung anderer Rosenkopplungskarten oder auch Kopplungskarten anderer verwandter Arten, wie z.B. *Fragaria* herangezogen werden.

5.4 Abschliessende Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit konnten in Hinblick auf die Ethylenempfindlichkeit von Rosen Sequenzen zu wichtigen Bestandteilen der Ethylenerkennung und Ethylenbiosynthese im Rosengenom lokalisiert werden.

Zudem wurde eine phänotypische Untersuchung der Population 94/1 mit Ethylenbegasung durchgeführt. Durch die phänotypische Untersuchung wurden QTLs für Haltbarkeit ermittelt und anschließend in der Kopplungskarte 94/1 kartiert.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit war die Untersuchung, ob in Rosen ein gametophytisches Selbstinkompatibilitätssystem existiert. Hierzu wurden Kreuzungsanalysen und Rückkreuzungsanalysen, Spaltungsanalysen von Markern auf der Si-Kopplungsgruppe, sowie DNA- und Protein-Sequenzvergleichen von SFB und Kartierung der SFB-Sequenz auf der Kopplungsgruppe drei, untersucht. Dass es sich um SFB handelt wurde mittels BLAST-Analyse in NCBI, Sequenzvergleichen mit *Prunus*-SFB-Sequenzen und Expressionsanalyse belegt.

Alle Ergebnisse belegen das Vorhandensein eines gametophytischen Selbstinkompatibilitätssystem in Rosen.

Im Rahmen der Si-Untersuchungen wurde aufgrund bestehender Syntänie die Kopplungsgruppe drei von Rosen mit der Si-Kopplungsgruppe von *Prunus* verglichen.

Es wird durch die Kartierung von sieben EST-Sequenzen von der Si-Kopplungsgruppe von *Prunus* auf verschiedene Kopplungsgruppen in der Kopplungskarte von *Rosa* eine Neuordnung des oberen Abschnitts der *Prunus*-Si-Kopplungskarte in *Rosa* vermutet.

Die Kopplungskarte 97/7 konnte mit einigen Mikrosatelliten und TE3 und TE4 Sequenzen erweitert werden und damit ein Beitrag für Syntänie-Untersuchungen zwischen den beiden Rosenpopulationen geleistet werden. Außerdem gibt die Lokalisierung der TE3 und TE4 Sequenzen zusammen mit den Mikrosatelliten Rh50 und Rh58 einen Hinweis auf den Si-Locus in der Population 97/7.

6. Literaturverzeichnis

- Anderson MA, Cornish EC, Mau S-L, et al. 1986.** Cloning of cDNA for a stylar glycoprotein associated with expression of self-incompatibility in *Nicotiana alata*. *Nature* **321**, 38-44
- Anderson MA, McFadden GI, Bernatzky R, Atkinson A, Orpin T, Dedman H, Tregear G, Fernley R, Clarke AE, 1989.** Sequence variability of three alleles of the self-incompatibility gene of *Nicotiana alata*. *The Plant Cell* **1**, 483-491
- Biber A, Kaufmann H, Terefe D, Debener T, 2009.** Microsatellite markers from a BAC contig spanning the *Rdr 1* locus: a tool for marker assisted selection in roses. *In Vorbereitung*.
- Bleecker AB, Estelle MA, Somerville C and Kende H, 1988.** Insensitivity to ethylene conferred by a dominant mutation in *Arabidopsis thaliana*. *Science* **241**: 1086-1089
- Bleecker AB, Kende H, 2000.** Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**: 1-18
- Bredemeijer GMM, Blaas J, 1981.** S-specific proteins in styles of self-incompatible *Nicotiana alata*. *Theor Appl Genet* **59**: 185-190
- Brewbaker JL, 1957.** Pollen cytology and self-incompatibility systems in plants. *J Hered* **48**: 271-277
- Capitani G, Hohenester E, Feng L, Storici P, Kirsch JF, Jansonius JN, 1999.** Structure of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, a key enzyme in the biosynthesis of the plant hormone ethylene. *J. Mol. Biol.* **294**: 745-756
- Chang C, Kwok SF, Bleecker AB, Meyerowitz EM, 1993.** *Arabidopsis* ethylene-response gene ETR1: Similarity of product to two-component regulators. *Science* **262**: 539-544
- Charlesworth D, Vekemans X, Castric V, Glemin S, 2005.** Plant self-incompatibility systems: a molecular evolutionary perspective. *New Phytologist* **168**: 61-69
- Cheng J, Han, Z, Xu X, Li T, 2006.** Isolation and identification of the pollen-expressed polymorphic F-box genes linked to the S-locus in apple (*Malus x domestica*). *Sex Plant Reprod.* **19**, 175-183
- Cheung AY, May B, Kawata E, Gu Q, Wu H-m, 1993.** Characterization of cDNAs for style transmitting tissue-specific proline-rich proteins in tobacco. *The Plant Journal* **3**, 151-160
- Cheung AY, Wang H, Wu H-m, 1995.** A floral transmitting tissue specific glycoprotein attracts pollen tubes and stimulates their growth. *Cell* **82**, 383-393
- Clark KR, Okuley JJ, Collins PD, Sims TL, 1990.** Sequence variability and developmental expression of S-alleles in self-incompatible and pseudo-self-incompatible *Petunia*, *The Plant Cell* **2**, 815-826

- Cole P & Melton B, 1986.** Self-compatibility and cross-compatibility relationships among genotypes and between ploidy of the rose. *HortScience* **111**: 122-125
- Cornish EC, Pettitt JM, Bönig I, Clarke AE, 1987.** Developmentally controlled expression of a gene associated with self-incompatibility in *Nicotiana glauca*. *Nature* **326**, 99-102
- Crane MB, Lawrence WJC, 1929.** Genetical and cytological aspects of incompatibility and sterility in cultivated fruits. *J Pomol Hortic Sci* **7**:276-301
- Crespel L, Chirollet M, Durel CE, Zhang D, Meynet J, Gudin S, 2002.** Mapping of qualitative and quantitative phenotypic traits in *Rosa* using AFLP markers. *Theor Appl Genet* **105**: 1207-1214
- Cruz-Garcia F, Hancock CN, McClure B, 2003.** S-RNase complexes and pollen rejection. *Journal of Experimental Botany* **54**, 123-130
- Darwin C, 1876.** The Effect of Cross and Self Fertilization in the Plant Kingdom. *John Murray, London*
- Debener T & Linde M, 2009.** Exploring Complex Ornamental Genomes: The Rose as a Model Plant. *Critical Reviews in Plant Science*, **28**: 267-280
- Debener T & Mattiesch L, 1999.** Construction of a genetic linkage map of roses using RAPD and AFLP markers. *Theor Appl Genet* **99**: 891-899
- Debener T, Mattiesch L, Vosman B, 2001.** A molecular marker map of roses. *Acta Hortic* **547**: 283-287
- de Graaf BHJ, 1999.** Pistil proline-rich proteins in *Nicotiana tabacum*. PhD thesis, Catholic University of Nijmegen, Netherlands
- de Nettancourt D, 2001.** Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plants. Springer, Berlin Heidelberg New York
- Dirlewanger E, Graziano E, Joobeur T, Garriga-Caldere F, Cosson P, Howad W, Arus P, 2004.** Comparative mapping and marker-assisted selection in Rosaceae fruit crops. *PNAS* **101 (26)**: 9891-9896
- Dugo ML, Satovic Z, Millan T, Cubero JI, Rubiales D, Cabrera A, Torres AM, 2005.** Genetic mapping of QTLs controlling horticultural traits in diploid roses. *Theor Appl Genet* **111**: 511-520
- Entani T, Iwano M, Shiba H, Takayama S, Fukui K, Isogai A, 1999.** Centromeric localization of an S-RNase gene in *Petunia hybrida* Vilm. *Theor. Appl. Genet.* **99**, 391-397
- Entani T, Iwano M, Shiba H, Che FS, Isogai A, Takayama S, 2003.** Comparative analysis of the self-incompatibility (S-) locus region of *Prunus mume*: Identification of a pollen-expressed F-Box gene with allelic diversity. *Genes Cells* **8**: 203-213

- Etheridge N, Hall BP, Schaller GE, 2006.** Progress report: ethylene signaling and responses. *Planta* **223**: 387-391
- Fankhauser C, Yeh KC, Lagarias JC, Zhang H, Elich TD, Chory J, 1999.** PKS1, a substrate phosphorylated by phytochrome that modulates light signaling in *Arabidopsis*. *Science* **284**: 1539-1541
- Franklin-Tong VE, Franklin FCH, 1992.** Gametophytic self-incompatibility in *Papaver rhoeas* L. *Sex Plant Reprod* **5**: 363-42
- Frohman MA., 1993.** Rapid amplification of complementary DNA ends for generation of full-length complementary DNAs: thermal RACE. *Methods Enzymol* **218**: 340-356
- Gamble RL, Coonfield ML, Schaller GE, 1998.** Histidine kinase activity of the ETR1 ethylene receptor from *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 7825-7829
- Gamble RL, Qu X, Schaller GE, 2002.** Mutational analysis of the ethylene receptor ETR1, role of the histidine kinase domain in dominant ethylene insensitivity. *Plant Physiol.* **128**: 1428-1438
- Geitmann A, Franklin-Tong VE, Emons AC, 2004.** The self-incompatibility response in *Papaver rhoeas* pollen causes early and striking alterations to organelles. *Cell Death and Differentiation* **11**: 812-822
- Goldraij A, Kondo K, Lee CB, Hancock CN, Sivaguru M, Vazquez-Santana S, Kim S, Philips TE, Cruz-Garcia F, McClure B, 2006.** Compartmentalization of S-RNase and HT-B degradation in self-incompatible *Nicotiana*. *Nature* **439**: 805-810
- Golz JF, Su V, Clarke AE, Newbigin E, 1999:** A molecular description of mutations affecting the pollen component of the *Nicotiana glauca* S locus. *Genetics* **152**: 1123-1135
- Golz JF, Oh H-Y, Su V, Kusaba M, Newbigin E, 2001:** Genetic analysis of *Nicotiana glauca* pollen-part mutants is consistent with the presence of an S-ribonuclease inhibitor at the S-locus. *Proc Nat Acad Sci USA* **98**: 15372-15376
- Gu YQ, Yang C, Thara VK, Zhou J and Martin GB, 2000.** Pti4 is induced by ethylene and salicylic acid, and its product is phosphorylated by the Pto kinase. *Plant Cell* **12**: 771-786
- Gudin S, 2000.** Rose: genetics and breeding. *Plant Breed Rev* **17**:59-189
- Guo J-R, Schnieder F, Verreet JA, 2006.** Differences between the fingerprints generated from RNA and poly-A RNA using a modified procedure of cDNA-AFLP and silver staining. *Biotechnology Letter*, **28**: 267-270
- Hancock CN, Kondo K, Beecher B, McClure BA, 2003.** The S-locus and unilateral incompatibility. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **358**, 1133-1140

- Hancock CN, Kent L, McClure BA, 2005.** The stylar 120 kDa glycoprotein is required for S-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *The Plant Journal* **43**, 716-723
- Haring V, Gray JE, McClure B, Anderson MA, Clarke A, 1990.** Self-Incompatibility: A Self-Recognition System in Plants. *Science* **250**: 937-941
- Hauck NR, Yamane H, Tao R, Iezzoni AF, 2006.** Accumulation of Nonfunctional S-Haplotypes results in the Breakdown of Gametophytic Self-Incompatibility in tetraploid *Prunus*. *Genetics* **172**: 1191-1198
- Hayashi K 1991.** PCR-SSCP: A Simple and Sensitive Method for Detection of Mutations in the Genomic DNA. Review. *PCR Methods Appl.* **1**: 34-38
- Hibrand-Saint Oyant L, Crespel L, Rajapakse S, Zhang L, Foucher F, 2008.** Genetic linkage maps of rose constructed with new microsatellite markers and locating QTL controlling flowering traits. *Tree Genetics & Genomes* **4**: 11-23
- Hirayama T, Kieber, JJ, Hirayama N, Kogan M, Guzman P, Nourizadeh S, Alonso JM, Dailey WP, Dancis A and Ecker JR, 1999.** RESPONSIVE-TO-ANTAGONIST1, a Menkes/Wilson, disease-related copper transporter, is required for ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Cell* **97**: 383-393
- Hiscock SJ, 2002.** Pollen recognition during the self-incompatibility response in plants. *Genome Biology* **3**(2): reviews 1004.1-1004.6
- Howad W,**
- Yamamoto T, Dirlewanger E, Testolin R, Cosson P, Cipriani G, Monforte AJ, Georgi L, Abbott AG, Arus P, 2005.** Mapping with a few plants: using selective mapping for microsatellite saturation of the *Prunus* reference map. *Genetics* **171**: 1305-1309
- Hua J, Chang C, Sun Q, Meyerowitz EM, 1995.** Ethylene insensitivity conferred by *Arabidopsis* ERS gene. *Science* **269**: 1712-1714
- Huang S, Lee H-S, Karunanandaa B, Kao T-H, 1994.** Ribonuclease activity of *Petunia inflata* S proteins is essential for rejection of self-pollen. *The Plant Cell* **6**, 1021-1028
- Ida K, Norioka S, Yamamoto M, Kumasaka T, Yamashita E, Newbiggin E, Clarke AE, Sakiyama F, Sato M, 2001.** The 1,55 Å resolution structure of *Nicotiana glauca* S_{F11}-RNase associated with gametophytic self-incompatibility. *J. Mol. Biol.* **314**, 103-112
- Igic B, Kohn JR, 2001.** Evolutionary relationships among self-incompatibility S-RNases. *Proc Nat Acad Sci USA* **98**: 13167-13171
- Ikeda K, Igic B, Ushijima K, Yamane H, Hauck NR et al., 2004.** Primary structural features of the S-haplotype-specific F-box proteins, SFB, in *Prunus*. *Sex. Plant Reprod.* **16**: 235-243

- Ioerger TR, Clark AG, Kao T-H, 1990.** Polymorphism of the self-incompatibility locus predates speciation. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 9732-9735
- Ioerger TR, Gohlke JR, Xu B, Kao T-H, 1991.** Primary structural features of the self-incompatibility protein in Solanaceae. *Sexual Plant Reproduction* **4**, 81-87
- Ishimizu T, Endo T, Yamaguchi-Kabata Y, Nakamura KT, Sakiyama F, Norioka S, 1998.** Identification of regions in which positive selection may operate in S-RNase of Rosaceae; implication for S-allele-specific recognition sites in S-RNase. *FEBS Letters* **440**, 337-342
- Ishimizu T, Mitsukami Y, Shinkawa T, Natsuka S, Hase S, Miyagi M, Sakiyama F, Norioka S, 1999.** Presence of asparagine-linked N-acetylglucosamine and chitobiose in *Pyrus pyrifolia* S-RNases associated with gametophytic self-incompatibility. *Eur J. Biochem.* **263**: 624-634
- Jahnen W, Batterham MP, Clarke AE, Moritz RL, Simpson RJ, 1989.** Identification, isolation and N-terminal sequencing of style glycoproteins associated with self-incompatibility in *Nicotiana glauca*. *The Plant Cell* **1**: 493-499
- Johnson PR, Ecker JR, 1998.** The ethylene gas signal transduction pathway: A molecular perspective. *Annu. Rev. Genet.* **32**: 227-254
- Kao T-h and McCubbin AG, 1996.** How flowering plants discriminate between self and non-self pollen to prevent inbreeding. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, **93**: 12059-12065
- Kao T-h and Tsukamoto T, 2004.** The molecular and genetic bases of S-RNase based Self-Incompatibility. *The Plant Cell* **16**: 72-83
- Karunanandaa B, Huang S, Kao T-H, 1994.** Carbohydrate moiety of the *Petunia inflata* S3 protein is not required for self-incompatibility interactions between pollen and pistil. *The Plant Cell* **6**: 1933-1940
- Kaufmann H., 1991.** Sequenzvariabilität und Genstruktur des Selbstinkompatibilitäts-Locus in *Solanum tuberosum* L.. Dissertation, Köln 1991.
- Kawata Y, Sakiyama F, Tamaoki H, 1988.** Amino-acid sequence of ribonuclease T₂ from *Aspergillus oryzae*. *Eur. J. Biochem.* **176**: 683-697
- Kieber JJ, Rothenburg M, Roman G, Feldmann KA, Ecker JK, 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
- Klustrup M and Kristiansen KN, 2000.** Rapid genome walking: a simplified oligo-cassette mediated polymerase chain reaction using a single genome-specific primer. *Nucleic Acids Research*, **28**: 11

- Kobayashi N, Horikoshi T, Katsuyama H, Handa T, Takayanagi K, 1998.** A Simple and Efficient DNA Extraktion Method for Plants, Especially Woody Plants. *Plant Tissue Culture and Biotechnology* Vol.4 (2): 76-81
- Kondo K, Yamamoto M, Itahashi R, Sato T, Egashira H, Hattori T, Kowyama Y (2002a).** Insights into the evolution of self-incompatibility in *Lycopersicon* from a study of stylar factors. *Plant Journal*. **30**, 143-154
- Kondo K, Yamamoto M, Itahashi R, Sato T, Hirai M, Norioka S, Hattori T, Kowyama Y (2002b).** Cultivated tomato has defects in both S-RNase and HT genes required for stylar function of self-incompatibility. *Plant Journal* **9**, 627-636
- Kutschera U, 2002.** Prinzipien der Pflanzenphysiologie. *Spektrum Verlag*, 2. Auflage, 2002
- Lai Z, Ma W, Han B, Liang L, Zhang Y, Hong G, Xue Y, 2002.** An F-box gene linked to the self-incompatibility (S) locus of *Antirrhinum* is expressed specifically in pollen and tapetum. *Plant Mol Biol* **50**: 29-42
- Lalli DA, Abbott AG, Zhebentyayeva TN, Badenes ML, Damsteegt V, Polak J, Krska B, Salava J, 2008.** A genetic linkage map for an apricot (*Prunus armeniaca* L.) BC1 population mapping plum pox virus resistance. *Tree Genetics & Genomes* **4**: 481-492
- Lansari A, Iezzoni A, 1990.** A preliminary analysis of self-incompatibility in sour cherry. *HortScience* **25**: 1636-1638
- Lee H-S, Huang S, Kao T-h, 1994.** S proteins control rejection of incompatible pollen in *Petunia inflata*. *Nature* **367**: 560-563
- Lewis D, 1943.** Physiology of incompatibility in plants. III. Autotetraploids. *J. Genet.* **45**: 171-185
- Li S, Samaj J, Franklin-Tong VE, 2007.** A mitogen-activated Protein Kinase signals to Programmed Cell Death by Self-Incompatibility in *Papaver* Pollen. *Plant Physiology* **145**: 236-245
- Liebermann M, Mapson LW, 1964.** Genesis and biogenesis of ethylene. *Nature* **204**: 343-345
- Liebhart R, Koller B, Gianfranceschi L, Gessler C, 2003.** Creating a saturated reference map for the apple (*Malus x domestica*Borkh) genome. *Theor Appl Genet* **106**: 1497-1508
- Lind JL, Bacic A, Clarke AE, Anderson MA, 1994.** A style-specific hydroxyproline-rich glycoprotein with properties of both extensins and arabinogalactan proteins. *The Plant Journal* **6**, 491-502
- Lind JL, Bönig I, Clarke AE, Anderson MA, 1996.** A style-specific 10 kDa glycoprotein enters pollen tubes of *Nicotiana glauca* in vivo. *Sexual Plant Reproduction* **9**, 75-86

- Linde M, Mattiesch L, Debener T, 2004.** Rpp1, a dominant gene providing race-specific resistance to rose powdery mildew (*Podosphaera pannosa*): molecular mapping, SCAR development and conformation of disease resistance data. *Theor Appl Genet* **109**: 1261-1266
- Livermore JR, Johnstone FE, 1940.** The effect of chromosome doubling on the crossability of *Solanum chacoense*, *S. jamesii* and *S. bulbocastanum* with *S. tuberosum*. *Am. Potato J.* **17**: 170-173
- Lundqvist A, 1964.** The nature of the two-loci incompatibility system in grasses. IV. Interaction between the loci in relation to pseudo-compatibility in *Festuca pratensis* Huds. *Hereditas* **52**, 221-234
- Lundqvist A, Osterbye U, Larsen K, Linde-Laursen IB, 1973.** Complex self-incompatibility systems in *Ranunculus acris* L. and *Beta vulgaris* L. *Hereditas* **74**, 161-168
- Luu DT, Qin X, Morse D, Cappadocia M, 2000.** S-RNase uptake by compatible pollen tubes in gametophytic self-incompatibility. *Nature*, **407**, 649-651
- Ma N, Lei C, Wangjin L, Hui T, Junping G, 2005.** Exogenous ethylene influences flower opening of cut roses (*Rosa hybrida*) by regulating the genes encoding ethylene biosynthesis enzymes. *C Life Sciences* **48(5)**: 434-444
- Ma RC and Oliveira MM, 2002.** Evolutionary analysis of S-RNase genes from Rosaceae species. *Mol Genet Genomics* **267**: 71-78
- Malek BV, Weber WE, Debener T, 2000.** Identification of molecular markers linked to Rdr1, a gene conferring resistance to blackspot in roses. *Theor Appl Genet* **101**: 977-983
- Matsuura T, Sakai H, Unno M, Ida K, Sato M, Sakiyama F, Norioka S, 2001.** Crystal structure at 1,5-Å resolution of *Pyrus pyrifolia* pistil ribonuclease responsible for gametophytic self-incompatibility. *J. Biol. Chem.* **276**, 45261-45269
- Matton DP, Maes O, Laublin G, Xike Q, Bertrand C, Morse D, Cappadocia M, 1997.** Hypervariable domains of self-incompatibility RNases mediate allele-specific pollen recognition. *Plant Cell* **9**: 1757-1766
- Matton DP, Bertrand C, Laublin G, Cappadocia M, 1998.** Molecular aspects of self-incompatibility in tuber-bearing *Solanum* species. In *Comprehensive Potato Biotechnology* (Khurana SMP, Chandra R, Upadhyya MD, ed.). New Delhi, India: Malhotra Publishing House, pp. 97-113
- Matton DP, Luu DT, Xike Q, Laublin G, O'Brien M, Maes O, Morse D, Cappadocia M, 1999.** Production of n S RNase with Dual Specificity suggests a novel Hypothesis for the Generation of New S Alleles. *The Plant Cell* **11**: 2087-2097

- Mayak S, Legge RL, Thompson JE, 1981.** Ethylene formation from 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid by microsomal membranes from senescing carnation flowers. *Planta* **153**: 49-55
- McClure BA, Haring V, Ebert PR, Anderson MA, Simpson RJ, Sakiyama F, Clarke AE, 1989.** Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana glauca* are ribonucleases. *Nature* **342**, 955-957
- McClure BA, Gray JE, Anderson MA, Clarke AE, 1990.** Self-Incompatibility in *Nicotiana glauca* involves degradation of pollen rRNA. *Nature* **347**, 757-760
- McClure BA, Du H, Liu Y-H, Clarke AE, 1993.** S-locus products in *Nicotiana glauca* pistils are subject to organ-specific post-transcriptional processing, but not post-translational processing. *Plant Molecular Biology* **22**, 177-187
- McClure BA, Mou B, Canevascini S, Bernatzky R, 1999.** A small asparagine-rich protein required for S-allele-specific pollen rejection in *Nicotiana glauca*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 13548-13553
- McClure BA, Cruz-Garcia F, Beecher BS, Sulaman W, 2000.** Factors affecting inter- and intraspecific pollen rejection in *Nicotiana glauca*. *Annals of Botany* **85**, 113-123
- McClure BA, 2006.** New views of S-RNase-based self-incompatibility. *Curr opinion in plant Biology* **9**: 639-646
- Mehta PK, Hale TI, Christen P, 1993.** Aminotransferases: Demonstration of homology and division into evolutionary subgroups. *Eur. J. Biochem.* **214**: 549-561
- Morgante M, Olivier AM, 1993.** PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant J* **3**: 175-182
- Müller R, Anderson AS, Serek M, 1998.** Differences in display life of miniature potted roses (*Rosa hybrida* L.). *Scient Hort.* **76**: 59-71
- Müller R, Lind-Iversen S, Stummann BM, Serek M, 2000a.** Expression of genes for ethylene biosynthetic enzymes and an ethylene receptor in senescing flowers of miniature potted roses. *J Hort. Science and Biotechnology* **75**: 12-18
- Müller R, Stummann BM, Serek M, 2000b.** Characterization of an ethylene receptor family with differential expression in rose (*Rosa hybrida* L.) flowers. *Plant Cell Reports* **19**: 1232-1239
- Müller R, Owen CA, Xue Z-T, Welander M, Stummann BM, 2002.** Characterization of two CTR-like protein kinases in *Rosa hybrida* and their expression during flower senescence and in response to ethylene. *J Exp Bot* **53(371)**: 1223-1225

- Murfett J, Atherton TL, Mou B, Gasser CS, McClure BA, 1994.** S-RNase expressed in transgenic *Nicotiana* causes S-allele-specific pollen rejection. *Nature* **367**: 563-566
- Neljubow D, 1901.** Ueber die horizontale Nutation der Stengel von *Pisum sativum* und einiger anderer. *Pflanzen Beih. Bot. Zentralbl.* **10**:128-239
- Nersissian AM, Immoos C, Hill MG, Hart JP, Williams G, Herrmann RG, Valentine JS, 1998.** Uclacyanins, stellacyanins, and plantacyanins are distinct subfamilies of phytocyanins: plant-specific monocuclear blue copper proteins. *Protein Science* **7**, 1915-1929
- Newbiggin E, Anderson MA, Clarke AE, 1993.** Gametophytic Self-Incompatibility Systems. *The Plant Cell* **5**, 1315-1324
- Nishitani C, Kimura T, Ueda E, Howad W, Arus P, Yamamoto T, 2007.** Tri/Hexanucleotide Microsatellite Markers in Peach derived from enriched Genomic Libraries and their Application in Rosaceae. *Breeding Science* **57**: 289-296
- O'Brien M, Kapfer C, Major G, Laurin M, Bertrand C, Kondo K, Kowyama Y, Matton DP, 2002.** Molecular analysis of the stilar-expressed *Solanum chacoense* small asparagine-rich protein family related to the HT modifier of gametophytic self-incompatibility in *Nicotiana*. *The Plant Journal* **32**, 985-996
- O'Brien M, Major G, Chantha S-C, Matton DP, 2004.** Isolation of S-RNase binding proteins from *Solanum chacoense*: identification of an SBP1 (RING finger protein) orthologue. *Sex Plant Reprod.* **17**, 81-87
- Oetiker JH, Olson DC, Shiu OY and Yang SF, 1997.** Differential induction of seven 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase genes by elicitor in suspension cultures of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Mol. Biol.* **34**: 275-286
- Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K (1989).** Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* **5**: 874-879
- Osterbye U, 1975.** Self-incompatibility in *Ranunculus acris* L. Genetic Interpretation and evolutionary aspects. *Hereditas* **80**, 91-112
- Pandey KK, 1968.** Colchicine induced changes in the self-incompatibility behaviour of *Nicotiana*. *Genetica* **39**: 257-271
- Paterson AH, Lander ES, Hewitt JD, Peterson S, Lincoln SE, Tanksley SD, 1988.** Resolution of Quantitative Traits into Mendelian Factors by using a complete Linkage Map of Restriction Fragment Polymorphisms. *Nature* **335**: 721-726

- Peck SC and Kende H, 1998.** Differential regulation of genes encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) synthase in etiolated pea seedlings: Effects of indole-3-acetic acid, wounding, and ethylene. *Plant Mol. Biol.* **38**: 977-982
- Pellinen R, Palva T and Kangasjarvi J, 1999.** Short communication: Subcellular localization of ozone-induced hydrogen peroxide production in birch (*Betula pendula*) leaf cells. *Plant J.* **20**: 349-356
- Pirrung MC, 1999.** Histidine kinases and two-component signal transduction systems. *Chem. Biol.* **6**: 167-175
- Qiao H, Wang F, Zhao L, Zhou J, Lai Z, Zhang Y, Robbins TP, Xue Y, 2004a.** The F-box protein AhSLF-S₂ controls the pollen function of S-RNase-based self-incompatibility. *Plant Cell* **16**: 2307-2322
- Qiao H, Wang F, Zhao L, Zhou J, Huang J, Zhang Y, Xue Y, 2004b.** The F-box protein AhSLF-S₂ physically interacts with S-RNases that may be inhibited by the ubiquitin/26S proteasome pathway of protein degradation during compatible pollination in *Antirrhinum*. *Plant Cell* **16**: 582-595
- Rajapakse S, Byrne DH, Zhang L, Anderson N, Arumuganathan K, Ballard RE, 2001.** Two genetic linkage maps of tetraploid roses. *Theor Appl Genet* **103**: 575-583
- Rajapakse S, 2003.** Gene mapping. In: Roberts A, Debener T, Gudin S (eds) *Encyclopedia of rose sciences*. Elsevier, Oxford, pp 326-334
- Ratsek JC, Flory WS, Yarnell SH, 1940.** Crossing relations of some diploid and polyploid species of roses. *Proc. Amer. Soc. Horticult. Sci.* **38**: 637-654
- Reid MS, Evans RY, Dodge LL, Mor Y, 1989.** Ethylene and silver thiosulphate influence opening of cut rose flowers. *J American Society of Horticulture Science* **114**: 436-440
- Ridout MS, Xu XM, Tobutt KR, 2005.** Single-Locus Gametophytic Incompatibility in Autotetraploids. *Journal of Heredity* **96(4)**: 430-433
- Ritter E, Gebhardt C, Salamini F, 1990.** Estimation of Recombination Frequencies and Construction of RFLP Linkage Maps in Plants from crosses between Heterozygous Parents. *Genetics* **125**: 645-654
- Roman G and Ecker JR, 1995.** Genetic analysis of a seedling stress response to ethylene in *Arabidopsis*. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **350**: 75-81
- Romero C, Vilanova S, Burgos L, Martinez-Calvo J, Vicente M, Llacer G, Badenes ML, 2004.** Analysis of the S-locus structure in *Prunus armeniaca* L. Identification of S-haplotype specific S-RNase and F-box genes. *Plant Molecular Biology* **56(1)**: 145-57

- Sambrook J, Russell DW (2001).** Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd edition. *Cold Spring Harbour Laboratory Press*, Cold Spring Harbour, NY, USA
- Sanguinetti CJ, Dias Neto E, Simpson AJ, 1994.** Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* **17(5)**: 914-921
- Sassa H, Nishio T, Kowyama Y, Hirano H, Koba T, Ikehashi H, 1996.** Self-incompatibility (S) alleles of the Rosaceae encode members of a distinct class of the T2/S ribonuclease superfamily. *Mol Gen Genet* **250**: 547-557
- Sassa H, Kakui H, Miyamoto M, Suzuki Y, Hanada T, Ushijima K, Kusaba M, Hirano H, Koba T, 2007.** *S Locus F-Box Brothers*: Multiple and Pollen-Specific F-Box Genes with S Haplotype-Specific Polymorphisms in Apple and Japanese Pear. *Genetics* **175**: 1869-1881
- Savage AE and Miller JS, 2006.** Gametophytic self-incompatibility in *Lycium parishii* (Solanaceae): allelic diversity, genealogical structure, and patterns of molecular evolution at the S-RNase locus. *Heredity* **96**: 434-444
- Schaller GE, Bleecker AB, 1995.** Ethylene-binding sites generated in yeast expressing the *Arabidopsis* ETR1 gene. *Science* **270**: 1809-1811
- Shibuya K, Nagata M, Tanikawa N, Yoshioka T, Hashiba T, Satoh S, 2002.** Comparison of mRNA levels of three ethylene receptors in senescing flowers of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *J of Experimental Botany* **53**: 399-406
- Sijacic P, Wang X, Skirpan A, Wang Y, Dowd P, McCubbin A, Huang S, Kao T-h, 2004:** Identification of the pollen determinant of S-RNase-mediated self-incompatibility. *Nature* **429**: 302-305
- Sims TL and Ordanic M, 2001.** Identification of a S-ribonuclease-binding protein in *Petunia hybrida*. *Plant Mol. Biol.* **47**, 771-783
- Singh A, Ai Y, Kao TH, 1991.** Characterization of ribonuclease activity of three S-allele-associated proteins of *Petunia inflata*. *Plant Physiol.* **96**, 61-68
- Slabaugh MB, Huestis GM, Leonard J, Holloway JL, Rosato C, Hongtrakul V, Martini N, Toepfer R, Voetz M, Schell J, Knapp SJ (1997).** Sequence-based genetic markers for genes and gene families: single-strand conformational polymorphisms for fatty acid synthesis genes of *Cuphea*. *Theor Appl Genet* **94**: 400-408
- Sonneveld T, Robbins TP, Boskovic R, Tobutt KR, 2001.** Cloning of six cherry self-incompatibility alleles and development of allele-specific PCR detection. *Theor Appl Genet* **102**: 1046-1055

- Sonneveld T, Tobutt KR, Vaughan SP, Robbins TP, 2005.** Loss of pollen-S function in two self-compatible selections of *Prunus avium* is associated with deletion/mutation of an S haplotype-specific F-box gene. *Plant Cell* **17**: 37-51
- Surplus SL, Jordan BR, Murphy AM, Carr JP, Thomas B and Mackerness SAH, 1998.** Ultraviolet-B-induced responses in *Arabidopsis thaliana*: Role of salicylic acid and reactive oxygen species in the regulation of transcripts encoding photosynthetic and acidic pathogenesis-related proteins. *Plant Cell Environ.* **21**: 685-694
- Takayama S, Isogai A, 2005.** Self-incompatibility in plants. *Annu Rev Plant Biol* **56**: 467-489
- Tamura M, Ushijima K, Sassa H, Hirano H, Tao R, Gradziel TM, Dandekar AM, 2000.** Identification of self-incompatibility genotypes of almond by allele-specific PCR analysis. *Theor Appl Genet* **101**: 344-349
- Tantz D, Schlötterer C, 1994.** Simple Sequences. *Curr Op. Genet. and Develop.* **4**: 832-837
- Tao R, Yamane H, Sugiura A, Murayama H, Sassa H, Mori H, 1999.** Molecular typing of S-alleles through identification, characterization and cDNA cloning for S-RNases in sweet cherry. *J Am Soc Hort Sci* **124**: 224-233
- Tao R, Watari A, Hanada T, Habu T, Yaegaki H, Yamaguchi M, Yamane H, 2006.** Self-compatible peach (*Prunus persica*) has mutant versions of the S haplotypes found in self-incompatible *Prunus* species. *Plant Mol Biol* **63**: 109-123
- Tarun AS, Theologis A, 1998.** Complementation analysis of mutants of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase reveals the enzyme is dimer with shared active sites. *J. Biol. Chem.* **273**: 12509-12514
- Thomas SG, Huang S, Li S, Staiger CJ, Franklin-Tong VE, 2006.** Actin depolymerization is sufficient to induce programmed cell death in self-incompatible pollen. *J of Cell Biology* **174** (2): 221-229
- Thompson J and Burdon J, 1992.** Gene-for-gene coevolution between plants and parasites. *Nature* **360**: 121-125
- Thorogood D, Armstead IP, Turner LB, Humphreys MO, Hayward MD, 2005.** Identification and mode of action of self-compatibility loci in *Lolium perenne* L. *Heredity* **94**: 356-363
- Tsai D-S, Lee H-S, Post LC, Kreiling KM, Kao TH, 1992.** Sequence of an S-protein of *Lycopersicon peruvianum* and comparison with other solanaceous S-proteins. *Sex. Plant Reprod.* **5**, 256-263

- Tsukamoto T, Ando T, Watanabe H, Marchesi E, Kao T-h, 2005.** Duplication of the S-locus F-box gene is associated with breakdown of pollen function in an S-haplotype identified in a natural population of self-compatible *Petunia axillaris*. *Plant Mol Biol* **57**: 141-153
- Ushijima K, Sassa H, Tao R, Yamane H, Dandekar AM, Gradziel TM, Hirano H, 1998.** Cloning and characterization of cDNAs encoding S-RNases from almond (*Prunus dulcis*): Primary structural features and sequence diversity of the S-RNases in Rosaceae. *Mol. Gen. Genet.* **260**, 261-268
- Ushijima K, Sassa H, Dandekar AM, Gradziel TM, Tao R, Hirano H, 2003.** Structural and transcriptional analysis of the self-incompatibility locus of almond: identification of a pollen-expressed F-box gene with haplotype-specific polymorphism. *Plant Cell* **15**: 771-781
- Ushijima K, Yamane H, Watari A, Kakehi E, Ikeda K, Hauck NR, Iezzoni AF, Tao R, 2004.** The S haplotype-specific F-box protein gene, SFB, is defective in self-compatible haplotypes of *Prunus avium* and *Prunus mume*. *Plant J* **39**: 573-586
- Vahala J, Schlagnhauser CD and Pell EJ, 1998.** Induction of an ACC synthase cDNA by ozone in light-grown *Arabidopsis thaliana* leaves. *Physiol. Plant.* **103**: 45-50
- Van der Straeten D, Rodrigues-Pousada RA, Villaroel R, Hanley S, Goodman HM and Van Montagu M, 1992.** Cloning, genetic mapping, and expression analysis of an *Arabidopsis thaliana* gene that encodes 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 9969-9973
- Vilanova S, Sargent DJ, Arus P and Monfort A, 2008.** Synteny conservation between two distantly-related Rosaceae genomes: *Prunus* (the stone fruits) and *Fragaria* (the strawberry). *BMC Plant Biol.* **8**: 67-79
- Von Malek B, Debener T, 1998.** genetic analysis of resistance to black spot (*Diplocarpon rosae*) in tetraploid roses. *Theor Appl Genet* **96**:228-231
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, et al. 1995.** AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* **23(21)**: 4407-4414
- Wang KL-C, Li H, Ecker JR, 2002.** Ethylene Biosynthesis and Signaling Networks. *The Plant Cell*, 131-151
- Wang KL-C, Yoshida H, Lurin C, Ecker JR, 2004.** Regulation of ethylene gas biosynthesis by the *Arabidopsis* ETO1 protein. *Nature* **428**: 945-950
- Wang W, Hall AE, O'Malley R, Bleeker AB, 2003.** Canonical histidine kinase activity of the transmitter domain of the ETR1 ethylene receptor from *Arabidopsis* is not required for signal transmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 352-357

- Wang Y, Wang X, Skirpan AL, Kao TH, 2003.** S-RNase mediated self-incompatibility. *J Exp Bot* **54**: 115-122
- Williams JKG, Kubelik A, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV, 1990.** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* **18**: 6531-6535
- Wright S, 1939.** The distribution of self-sterility alleles in populations. *Genetics* **24**: 538-552
- Wünsch A and Hormaza J, 2004.** Cloning and characterization of genomic DNA sequences of four self-incompatibility alleles in sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Theor Appl Genet* **108**: 299-305
- Wu H-m, Wang H, Cheung AY, 1995.** A pollen tube growth stimulatory glycoprotein is deglycosylated by pollen tubes and displays a glycosylation gradient in the flower. *Cell* **83**, 395-403
- Xue J, Li Y, Tan H, Yang F, Ma N, Gao J, 2008.** Expression of ethylene biosynthetic and receptor genes in rose floral tissues during ethylene-enhanced flower opening. *J Exp Bot.* **59(8)**: 2161-2169
- Yamane H, Murayama H, Tao R, Sugiura A, 2000.** Determining the S-genotypes of several sweet cherry cultivars based on PCR-RFLP analysis. *J. Hort Sci Biotec* **75**: 562-567
- Yamane H, Ikeda K, Hauck NR, Iezzoni AF, Tao R, 2003.** Self-incompatibility (S) locus region of the mutated S⁶-haplotype of sour cherry (*Prunus cerasus*) contains a functional pollen S allele and a non-functional pistil S allele. *J of Exp Botany* **54(392)**: 2431-2437
- Yan Z, Denneboom C, Hattendorf A, Dostra O, Debener T, Stam P, Visser PB, 2005.** Construction of an integrated map of rose with AFLP, SSR, PK, RGA, RFLP, SCAR and morphological markers. *Theor Appl Genet* **110**: 766-777
- Yang SF and Hoffmann NE, 1984.** Ethylene Biosynthesis and its Regulation in Higher Plants. *Ann. Rev. Plant Physiol*, **35**: 155-89
- Yang B, Thorogood D, Armstead I, Barth S, 2008.** How far are we from unravelling self-incompatibility in grasses? *New Phytol.* **178(4)**: 740-53
- Yokoya K, Roberts AV, Mottley J, Lewis R, Brandham PE, 2000.** Nuclear DNA amount in roses. *Ann Bot* **85**:557-561
- Zhang L, 2003.** Genetic linkage mapping in tetraploid and diploid rose. *Dissertation*, Clemson University, pp 1-160.

Abkürzungsverzeichnis

ACC	1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid
ACO	ACC-Oxidase
ACS	ACC-Synthase
APS	A mmonium p eroxisulfat
CAPS	Cleaved Amplified Polymorphic Sequence
CTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
CTR	constitutive triple response
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dNTPs	Desoxynucleotidtriphosphat
EDTA	E thylendiamintetraacetat
EIL	ethylene insensitive 3 like (Transkriptionsfaktor)
EIN	ethylene insensitive (Transkriptionsfaktor)
EREBP	ethylene-responsive element binding protein
ERF	e thylene r esponse f actor (Transkriptionsfaktor)
ERS	ethylene response sensor
ETR	ethylene response
FB	Freezing Broth Medium
IPTG	I sopropyl- β -D- T hiogalactosid
LB	Luria-Bertani Medium
LOD	Likelihood of the Odds
MAP	mitogen-activated protein
ml	Milliliter
OD	Optische Dichte
PCR	P olymerase- C hain- R eaction
PEG	P olyethylenglykol
μ l	Mikroliter
QTL	Q uantitative T rait L ocus
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SI	Self-incompatibility bzw. Selbstinkompatibilität
SFB	S-haplotype-specific-F-Box
SLF	S-Locus-F-Box
SSCP	S ingle- S equence- C onformation- P olymorphism
TAE	T ris- A cetate- E DTA (Elektrophoresepuffer für Agarose-Gele)
TBE	T ris- B orsäure- E DTA (Elektrophoresepuffer
TE	T ris- E DTA-DNA-Puffer
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minuten
X-Gal	5-Brom-4Chlor-3-Indolyt-b-D-Galactosid

Tabellenverzeichnis

- Tab. 1:** Genkarten von Rosen
- Tab. 2:** Standardprogramm für eine Polymerase-Kettenreaktion
- Tab. 3:** Sequenzen der GSP-Primer für 3`RACE
- Tab. 4:** Sequenzen der GSP-Primer für 5`RACE
- Tab. 5:** GSP-Primer-Sequenzen
- Tab. 6:** Beispiel für die Auswertung von SSCP-Banden
- Tab. 7:** Programm für Insert-PCR
- Tab. 8:** PCR-Programm für Sequenzierungen
- Tab. 9:** Programme und Webseiten
- Tab. 10:** Übersicht der Primer zur Ethylenempfindlichkeit
- Tab. 11:** Ergebnisse der SSCP-Analyse
- Tab. 12a+b:** Ergebnisse der Sequenzanalyse zur Untersuchung der Ethylenempfindlichkeit
- Tab. 13:** Verteilung der Allelkombinationen von 55 Individuen der Nachkommenschaft 94/1
- Tab. 14:** Spaltungsmuster der Nachkommenschaft 94/1 für die Primerpaare TE3 und TE4
- Tab. 15:** Ergebnisse der analysierten TE-Primer
- Tab. 16:** Ergebnisse der Sequenzanalyse von PCR-Produkten der TE-Primer
- Tab. 17:** Primer für S-Locus spezifische F-Box-Proteine
- Tab. 18:** Primer für die Griffelkomponente des Si-Systems
- Tab. 19:** Primer für andere Si-Komponenten
- Tab. 20:** Spaltungsmuster der Primerpaare SFB2+2 und BAC65F8 in der Population 94/1
- Tab. 21:** Kartierte Strukturgene auf der Kopplungskarte 94/1
- Tab. 22:** Spaltungsanalyse der Si-Kopplungsgruppen der Populationen 94/1 und 97/7
- Tab. 23:** QTL-Analyse

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1:** Ethylenrezeptoren
- Abb. 2:** Ethylensignalkaskade
- Abb. 3:** Ethylenbiosynthese
- Abb. 4:** Genetische Selbstinkompatibilität
- Abb. 5:** Die gametophytische und sporophytische Selbstinkompatibilität
- Abb. 6:** Strukturvergleich verschiedener RNasen (MATSUURA et al. 2001)
- Abb. 7:** Genetische Struktur von S-RNasen (Solanaceae) aus KAO & MCCUBBIN 1996
- Abb. 8:** Inhibitormodell nach LUU et al. (2000) für Solanaceae
- Abb. 9:** Inhibitormodell nach USHIJIMA et al. (2004) für *Prunus*
- Abb. 10:** Kompetitive Si-Reaktion nach CHARLESWORTH et al. (2005)
- Abb. 11:** Hypothese zum Selbstinkompatibilitätsmechanismus (GOLDRAJ et al. 2006)
- Abb. 12:** Stammbäume von SLF-Proteinen und S-RNasen aus CHENG et al. (2006)
- Abb. 13:** Schematische Darstellung der Schwerpunkte dieser Arbeit
- Abb. 14:** Kreuzungsschema der Population 94/1
- Abb. 15:** Kreuzungsschema der Population 97/7
- Abb. 16:** RNA-Quantifizierung von Antheren, Blättern, Griffeln und Petalen
- Abb. 17:** Primer für 3`RACE mit in rot gekennzeichneten Änderungen
- Abb. 18:** GenomeWalking aus dem Protokoll von Clontech
- Abb. 19:** Actin-Kontrolle
- Abb. 20:** SSCP-Gel mit PCR-Produkten des Primerpaares RhCTR
- Abb. 21:** Ethylenbegasung
- Abb. 22:** Blattbestand der Elternpflanzen in Prozent
- Abb. 23:** Häufigkeitsverteilung des Blattbestandes der Population 94/1 nach Ethylenbegasung
- Abb. 24:** SSCP-Gel mit PCR-Produkten der Primer RhACS5, RhETR2 und RhETR3 von einigen Individuen der Pop. 94/1
- Abb. 25:** Ergebnisse der QTL-Analyse der phänotypischen Untersuchung zur Ethylenempfindlichkeit
- Abb. 26:** Punnett-Squares für die Vererbung der Blütenfüllung
- Abb. 27:** Punnett-Square für die Elternpflanzen 93/1-117 und -119 im theoretischen Fall von vier verschiedenen Si-Allelen

- Abb. 28:** Punnett-Square für die Elternpflanzen 93/1-117 und -119 im theoretischen Fall von drei verschiedenen Si-Allelen
- Abb. 29:** Punnett-Squares für Rückkreuzungen von Individuen aus der Population 94/1 mit den Eltern 93/1-117 und -119 bei insgesamt drei verschiedenen Si-Allelen
- Abb. 30:** Ausschnitt aus der Kopplungsgruppe drei des Genotyps 93/1-119
- Abb. 31:** Alignment von der TE3-Sequenz mit der Prunus-Referenzsequenz
- Abb. 32:** SSCP-Analyse der TE4 PCR-Produkte
- Abb. 33:** Ausschnitt aus der Rosenkopplungskarte 94/1
- Abb. 34:** Kopplungsgruppe sechs aus der Prunus-Referenzkarte mit selbsterstellten TE-Primern (in grün)
- Abb. 35:** BLAST-Ergebnis für die Sequenz des Primerpaares Si15
- Abb. 36:** Alignment von Si15-Sequenzen verschiedener Kreuzungselter mit Prunus-SFB-Sequenzen
- Abb. 37:** Alignment von Si15-Protein-Sequenzen
- Abb. 38:** Zusammensetzung der SFB-Sequenz
- Abb. 39:** SFB-Struktur
- Abb. 40:** Amplifikation des Primerpaares SFB1289+112
- Abb. 41:** Expressionsanalyse der SFB-Sequenz
- Abb. 42:** Hybridisierung der BAC-Bank
- Abb. 43:** HindIII-Restriktionsverdau der BAC-Klone
- Abb. 44:** Agarose-Gel zur Überprüfung der PCR mit den BAC-Klonen und dem Primerpaar Si15
- Abb. 45:** Hybridisierung der BAC-Klone nach HindIII-Verdau mit einer Si15-Sonde
- Abb. 46:** Ausrichtung der BAC-Klone zueinander durch Analyse der BAC-Enden mittels PCR
- Abb. 47:** Ergebnis der Ausrichtung der BAC-Klone zueinander
- Abb. 48:** PCR-Produkte der Primerpaare 65F8 und SFB2+2 (Pop. 94/1) im SSCP-Gel
- Abb. 49:** Analyse von PCR-Produkten der Si-Primern 7, 10, 10b und 14
- Abb. 50:** Kopplungskarte für die Population 94/1
- Abb. 51:** Ausschnitt aus dem Mikrosatelliten-Gel von Rh58
- Abb. 52:** Kopplungsgruppen der Mutterpflanze 95/13-39
- Abb. 53:** Kopplungsgruppen von Spalier3
- Abb. 54:** Übersicht über die Untersuchung des GSI-Systems in Rosen
- Abb. 55:** Untersuchungen zur SFB-Sequenz

7. Anhang

7.1 Pufferlösungen und Kulturmedien

Puffer und Reagenzien	
Bindesilan	0,3 % (v/v) Methacryloxypropyltrimethoxysilan 0,3 % (v/v) Essigsäure in 100 % Ethanol
Extraktionspuffer für Griffelproteine (nach ANDERSON et al., 1986, modifiziert)	50 mM Tris pH 8,5 10 mM EDTA 1 mM CaCl ₂ 1 mM DTT 1 mM PMSF 10 µl/ ml Leupeptin 700 mM Saccharose 500 mM Tris 50 mM EDTA
Extraktionspuffer für Griffelproteine	100 mM KCl 2 % β-Mercaptoethanol 2 % PMSF pH 8,0 (HCl)
Fällungslösung für Griffelproteine	0,1 M Ammoniumacetat in Methanol
Hybridisierungspuffer	6xSSC (18M NaCl, 3M Tris Sodium Citrat) 5x Denhardt`s (100x = 2g BSA, 0,05M Ficoll 400, 0,055M) 0,5% SDS 20 µl denaturierte Heringssperma-DNA
Hybridisierung Waschpuffer	1x SSC 0,1% SDS
Kobayashi Puffer I (nach KOBAYASHI et al., 1998)	50 mM Tris/ HCl pH 8,0 5 mM EDTA 350 mM Sorbitol 1 % (v/v) Mercaptoethanol 10 % (w/v) Polyethylenglykol 6000
Kobayashi Puffer II (nach KOBAYASHI et al., 1998)	50 mM Tris/ HCl pH 8 5 mM EDTA 350 mM Sorbitol 1 % (v/v) Mercaptoethanol 1 % (w/v) Sodiamsarkosyl 710 mM NaCl 0,1 % (w/v) CTAB
10 x Ladepuffer für Agarose-Gele	0,25 % (w/v) Bromphenolblau 30 % (v/v) Glycerin
Miniprep Lösung I	9 % Glucose 0,025 M Tris 0,01 M EDTA
Lösung II	0,2 N NaOH 1% SDS 3M KAc
Lösung III	11,5%ige Essigsäure

Silberfärbung	
Fixierlösung	7,5 % (v/v) Essigsäure
Färbelösung	5,9 mM Silbernitrat 0,15% (v/v) Formaldehyd
Entwicklungslösung	9,4 mM Natriumcarbonat 6,4 µM Natriumthiosulfat 0,15% (v/v) Formaldehyd
Stopp-Lösung	= Fixierlösung
Southern Blot	
Denaturierungslösung	15 M NaCl 0,5 M NaOH
Depurinierungslösung	0,125 M HCl
Neutralisierungslösung	15 M NaCl 0,5 M Tris/ HCl, pH 7,5
Transferpuffer	20 x SSC (60M NaCl, 10M Tris Sodium Citrat)
SSCP Ladepuffer	95 % Formamid 0,01 M NaOH 0,05 % Xylencyanol 0,05 % Bromphenolblau
1 x TAE	40 mM Tris 1 mM EDTA pH 8 mit konz. Essigsäure
1 x TBE	89 mM Tris 89 mM Borsäure 2 mM EDTA (pH 8,0)
1 x TBE Long Run	134 mM Tris 45 mM Borsäure 2,5 mM EDTA (pH 8,0)
TE-(Tris-EDTA) Puffer	10 mM Tris-HCl pH 8,0 1 mM EDTA
1 x Williamspuffer	10 mM Tris-HCl pH 8,0 50 mM KCl 2 mM MgCl ₂ 0,001 % Gelatine (BioRad)

Kulturmedien	
FB (Freezing Broth)	1 % (w/v) Bacto™ Pepton (BD) 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 85,5 mM Natriumchlorid 36,2 mM K ₂ HPO ₄ 13,2 mM KH ₂ PO ₄ 1,5 mM Natriumcitrat 6,8 mM Ammoniumsulfat 365 µM Magnesiumsulfat 4,4 % (v/v) Glycerin
LB (Luria-Bertani) Flüssigmedium	1 % (w/v) Bacto™ Pepton (BD) 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 171 mM Natriumchlorid pH 7,0 mit 5 M NaOH

LB (Luria-Bertani) Festmedium	1 % (w/v) Bacto™ Pepton (BD) 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 171 mM Natriumchlorid 1,5 % (w/v) Bacto™ Agar (BD)
SOB	2 % (w/v) Bacto™ Pepton (BD) 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 8,5 mM Natriumchlorid 2,5 mM KCl pH 7,0 mit 5 M NaOH
SOC	SOB 20 mM Glukose 10 mM Magnesiumsulfat 10 mM Magnesiumchlorid

7.2 Bakterienstamm

Bakterienstamm	Genotyp	Hersteller
E. coli DH10B	F-mcrA D(mrr-hsd RMS-mcrBC) f80dlacZDM15 DlacX74 deoR recA1 endA1 araD139 D(ara, leu)7697 galU galK l-rpsL nupG	Invitrogen

7.3 Restriktionsenzyme und Hersteller

Enzym	Hersteller
Alu I	Fermentas
DraI	Clontech
EcoI	Clontech
Fal	SibEnzym
HindIII	Fermentas
MboI	Fermentas
Mse	Fermentas
PvuI	Clontech
Rsa	Fermentas
Sau3A = BfuCI	BioLabs
Stu (=Eco1471)	Clontech (Fermentas)
Taq	Fermentas

7.4 Hersteller

Materialien	Hersteller
Elektroporationsküvetten (0,2 cm)	Invitrogen
Eppendorf-Reaktionsgefäße 2ml, 1,5ml, 0,5ml	Eppendorf
Falconröhrchen	Eppendorf
Gummiabdeckmatten für Mikrotiterplatten	Biozym
Mikrotiterplatten 96 Well	Techne
Petrischalen	Fisher (D)
Zentrifugenbecher	Fisher

Geräte	Hersteller
Doppellaser-Sequenzsystem 4200	LI-COR
E. coli-Pulser	BioRad
Fotometer	Scientific Instruments
Horizontale Elektrophoresekammern	MWG Biotech
Lichttisch	Biotec Fischer
Schwingmühle	Retsch
Thermocycler:	
Genius	Techne
Mastercycler Gradient	Eppendorf
UV-Tisch	Bachofer
Vertikales SSCP-Elektrophoresesystem	Peqlab
Wasserbad, Typ 1083	GFL
Zentrifugen:	
Biofuge 13R	Heraeus Sepatech
Sorvall RC-5C Plus Superspeed	Kendro
Universal 16 R	Hettich Zentrifugen

7.5 Primersequenzen

Ethylenerkennung und Ethylenbiosynthese

Gen	Primer	Primersequenzen
ACC-Synthase	RhACS1f	GCC ACT GGA GCT AAC GAG AC
	RhACS1r	TGT TTC GGG CCT TTT CAT AG
ACC-Synthase	RhACS2f	AAA ACC CAG AAG CCT CCA TT
	RhACS2r	AAG GAA CGG GAA CCA GAA AT
ACC-Synthase	RhACS3f	CCA TGG CCT TTT GTC CTT TA
	RhACS3r	ATA TTC ACA CCG GTC CTC CA
ACC-Synthase	RhACS4f	GCT TCC AAC TTG GGA TCA AA
	RhACS4r	GGG GTT GGA ACT AGC AAA G
ACC-Synthase	RhACS5f	AAT CCA TTT TTG GGG AGC TT

	RhACS5r	ACG CCA CTT GAG GTC TCT GT
Cytoplasm.Rezeptor	RhCTR1f	GCT TCT GAT GTT GCT GTG AA
	RhCTR1r	GGA ATC TTT GAG GCC ATT GA
Cytoplasm.Rezeptor	RhCTR2f	TTC CTT CCA AGG GGA AGT CT
	RhCTR2r	TAA AAT TGG CTT GGA GTG GG
Ethylenrezeptor	RhETR1f	TGG TAT GAA CCT TCA ACT TTC TCA T
	RhETR1r	TCG CAT AGA CTC TTC AAG AAT AGC A
Ethylenrezeptor	RhETR2f	CTC AAA CTT CCA AAT CAA TGA CTG
	RhETR2r	ATA TTC TGC TCC ATT AGC AGA TCC
Ethylenrezeptor	RhETR3f	CAC TGC TAT AAC GCT CAT CAC TCT
	RhETR3r	CAT TAG TTG GGA CTC TTC AAG GAT
Ethylenrezeptor	RhETR4f	TTT GAA TCT GCA ACT TTC TCA CAC
	RhETR4r	GCA TTT CGT GGT TCA TGA CA
Transkriptionsfaktor	RhERFf	TTC TTC CAC GGG TCT CTG ATC TC
	RhERFf	TTA CAG AGG CGT TAG GAA GC
Transkriptionsfaktor	RhEIN3f	CCC TGC AGC CAT AGA CAA GT
	RhEIN3f	TTG GTG GAT GAA ATC AGG GT
Transkriptionsfaktor	RhEILf	TCC CTG GTT TGA TGG AAG AC
	RhEILr	TAA TGA GGA ATG GTG GCC TC

Die Ethylen-Primer wurden von Dr. Heiko Mibus von dem Institut für Zierpflanzen- und Gehölzwissenschaften der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover zur Verfügung gestellt.

Primersequenzen für SFB

Gen	Primer	Primersequenzen
SLFL2-Primer	Si 5f	TGGCAACGTTGAGCAAATTTTCTG
	Si 5r	CTATCTCATCGTCGTCGTCTTC
S6-exon-F1	Si 6f	CCAACCTCAAAGATGACATTC
S6-C3R	Si 6r	TCCTTACAGCCTTATAGTCG
SFB-1rev	Si 8f	TAAACCTCAACCGCCAAGAC
SFB-5forw	Si 8br	TAGGACCCCTCCAATGAGC
SFB-1rev	Si 8f	TAAACCTCAACCGCCAAGAC
SFB-6forw	Si 8cr	TGGGTTCTGCAAGAGAAACG
SFBc-F	Si15f	TCGACATCCTAGTAAGACTACCTGC
SFBc-R	Si15r	ATTTCTTCACTGCCTGAATCG
RFB1-F	Si18f	CAGCTCGAGTTTTGTTAGCATAC
kombinieren mit SFBc-R		
RFB2-F	Si19f	GCAGCTCAAGTTTTGTTAGTGC
kombinieren mit SFBc-R		
PaSFB3-F	Si20f	CCACAATTTGAACGTCAGAAC
PaSFB3-R	Si20r	GATTTCCGCATATCTCATGAC
PaSFB4-F	Si21f	TTGAACGTTTGGTGCACC

PaSFB4-R	Si21r	TACACAAATGCAGATCTCCTATG
PcSFB26-F	Si24f	GATTTGCTTGCTTTTTAAATGTTACGG
PcSFB26-R	Si24r	CTTAATTCTTGTGTCAAGAACTTGCC
SFBf1	Si25f	GCTTTTCATTGCCATTACC
SfinsR0	Si25r	GACCTGGGCATCTCACTTGT
SCa01F	Si26f	GATTGGTGGGGATGTGCTGTAG
SCa01R	Si26r	CTTCGGTAACCATAAGAATCTC
SLFL2F3	Si27f	TGAGAGGATACGCATTGAGC
SLFS2R3	Si27r	ACCAGAGAGTCTTTCCACTG
SLFL3F2	Si28f	TGGTGAATCTGTCCACATTG
SLFL3R2	Si28r	ACTTGCGTCTTTTCCTCCTC
Primerkombinationen für Si15:		
	SFB1forw	CATGCAAAGCATGGAGTGAT
	SFB1rev	CGTTTCCAACGTTTGTCTTG
	SFB2forw	GCAGCCCAGATTTTGTCTCT
	SFB1rev	CGTTTCCAACGTTTGTCTTG
	SFB1forw	CATGCAAAGCATGGAGTGAT
	SFB2rev	AAAGCCCTCCTCATCAGAAA
	SFB2forw	GCAGCCCAGATTTTGTCTCT
	SFB2rev	AAAGCCCTCCTCATCAGAAA
	SFB3forw	ACCTGCAAAAACCTAATGC
	SFB3rev	CCCCGATCGTATGATAACAA
	SFB1forw	CATGCAAAGCATGGAGTGAT
	SFB4rev	TTCGTTATAGCCAACCTCTCGTG
	SFB2forw	GCAGCCCAGATTTTGTCTCT
	SFB4rev	TTCGTTATAGCCAACCTCTCGTG
	SFB5forw	TTTAAACGGGTGGTCGATTT
	SFB5rev	ACGAACTTCCCTGKTTTCGT
	SFB6f	CATCTACTCTGCCTCCACCA
	SFB5r	ACGAACTTCCCTGKTTTCGT
	SFB7f	CGATTTGGAGGATCCATATGTT
	SFB7r	CAACTCTCGTGATGSCCAACT
	SFB8f	GCTCTTCAATGGTCTTTCTTTCA
	SFB7r	CAACTCTCGTGATGSCCAACT
	SFB9f	GGTGGTCGATTTGGAGGAT
	SFB10f	CATGCAAAGCATGGAGTGAT
	SFB10r	TKATACCTAGAATCTGGAAGGRAAAA
	SFB11f	GCAGCCCAGATTTTGTCTCT
	SFB10r	TKATACCTAGAATCTGGAAGGRAAAA
	SFB10f	CATGCAAAGCATGGAGTGAT
	SFB12r	CACTGKTMAGTCGTGCCAGA
	SFB13f	TTTAAACGGGTGGTCGATTT
	SFB12r	CACTGKTMAGTCGTGCCAGA

IntronSFB2f	AATGATGCGGATCAACAAGG
IntronSFB2r	AGGGGTTCGGTTTTAGCAAT
IntronSFB2f	AATGATGCGGATCAACAAGG
IntronSFB2r2	GAATTCTTCACTGCCCCAAT
IntronSFB2f	AATGATGCGGATCAACAAGG
IntronSFB2r3	GAAGTATGACGGACTCTGG

Literaturangaben zu den Primern, sofern nicht selbst erstellt mit Primer3: SONNEVELD et al., 2005; HAUCK et al.; 2006. ROMERO et al., 2004; USHIJIMA et al., 2004.

Primersequenzen für S-RNase

Gen	Primer	Primersequenzen
Pru-C2	Si 7f	CTATGGCCAAGTAATTATTCAAACC
Pru-C4R	Si7 r	GGATGTGGTACGATTGAAGCG
1824	Si 9f	CGCGGAAGCTTYACKATTACGGGCTTTGGCCGGATAA
1825	Si 9r	GCGAGGATCCATATACCTATCTCITTTAGCTC
Si10 forw	Si10 forw	GCCAAGTAATTATTCAA
Si10 rev	Si10 rev	GTTGATTACAGTCAATCT
Si10 forw	Si10 forw	GCCAAGTAATTATTCAA
Si10b rev	Si10b rev	GCAACGAAGRRVGGGTGTTCT
Si11 forw	Si11 forw	CCTVRAHTGVDKCCAAACTG
Si11 rev	Si11 rev	YCGSAYKTGGTACGATTGA
Si12 forw	Si12 forw	TTCACCATYCATGGCCTWTGGCCA
Si12 rev	Si12 rev	CCATTGTTGCACAAAYTGAAAATA
Si13 forw	Si13 forw	TATTTTCARTTTGTGCAACAATGG
Si13 rev	Si13 rev	ACAWYTRCCRTGTTTGTTCATTC
SRc-F	Si14f	CTCGCTTTCCTTGTCTTGC
Pru_C5	Si14r	TACCACTTCATGTAACAACACTGAG
RS1-F (mit Pru-C4R)	Si16f	GACAGGAACGTGTCACTCA
RS2-F (mit Pru-C4R)	Si17f	TGAGGCAAGGAAAAGTGTACC
Ishimizu-F	Si22f	TTTACGCAGCAATATCAG
Ishimizu-R	Si22r	GYGGGGGCARTYTATGAA
PcS13-F	Si23f	AGCAAACCTTCCCACCAAC
PcS13-R	Si23r	AGGAGGGGTGTTCTTCCAGT
	Si29f	TCGGATGTGGTACGATTGAA
	Si29r	CTTGCCRRACGTGGAAAGT
	Si30f	ATTTGGCCGAACGTAYTCAA
	Si30r	YCCGGWTRATRTTSGCYTTK
	Si31f	CCCAGTTGGAAATTATTTGGCC
	Si31r	TTTTGGCACTTGARTTTTGGTT
ROS4 u. 5		ACGGGGATGATATARTGGTTA
		TAGCTAGCCGCGCTCTTAATAC
Primer für Si14:	RNase1forw	CTCGCTTTCCTTGTCTTGC
	RNase1rev	TGTAACAACACTGAGGCCTGGA

RNase1forw	CTCGCTTTCCTTGTTCTTGC
RNase2rev	CCTGGATCGGGGTTACCTAT
RNase2forw	AACCACAAGTTGGACCCTTG
RNase2rev	CCTGGATCGGGGTTACCTAT
RNase1forw	CTCGCTTTCCTTGTTCTTGC
RNase1brev	ACGATGATGGACCAGGACTC

Literaturangaben zu den Primern, sofern nicht selbst mit Primer3 erstellt: TAO et al., 1999; KAUFMANN Diss., 1991., ROMERO et al., 2004; ISHIMIZU et al., 1998, HAUCK et al., 2006.

Primer für andere Si-Faktoren

Gen	Primer	Primersequenzen
120k	120kf	CCTCTAATCATCGTCGGCCATGT
	120kr	GGTCTTTCTAATAATGAAGAGCTCG
HT-B	HT-NS1	TTTCTTTGGTTCTTWTGATWATATCATCA
	HT-NS2	ATATCATCAGARGTTATTGCWAGGGAWATG
	HT-C1	TCCTTTATTCAACCAATYTCATATTA
	HT-C2 β	CAAAAATATTACATAATATTTTGTAGTCG
RNase	C1	TATTTTCAATTTGTGCAACA
	C5	CAAAATACCACTTCATGTAA

Literaturangaben: HANCOCK et al., 2005, O'BRIEN et al., 2002, KATO & MUKAI 2004, SONNEVELD et al., 2001.

Primer für 3'-RACE

Gen	Primer	Primersequenzen
Si15	SFB le2	TTGAGCAGGGCTTGGGGTTA
Si15	SFB le4	TCCCTCCAATTTGGGTCCA
Si15	SFB le8	GCCTCATGTCCTTCGATTCCAGG
Si14	RNaseRACe1	ACCACAAGTTGGACCCTTGG
Si14	RNaseRACe2	GGCACCACGTAATGGATGTG
Si14	RNaseRACe3	GGGAGTCCTGGTCCATCATC
Si14	RNaseRACe4	ATGTGGGAGTCCTGGTCCAT

Die Primer wurden mit Primer3 aufgrund der vorhandenen Sequenz von dem Primerpaar Si15 bzw. Si14 erstellt.

Primer für 5'-RACE

Primer	GSP	Sequenz
Si15	5RACE_384	TGGACGGGTTCCATATGATT
Si15	5RACE_348	TCAAACTTCGTCGGGATTC
Si15	5RACE_251	GCCCTGCTCAAATGTTTCAT

Die Primer wurden mit Primer3 aufgrund der vorhandenen Sequenz von dem Primerpaar Si15 erstellt.

Primer für Genome Walking

GSP	Bezeichnung	Sequenzen
GSP2	Si15_158	GTGGTGGAGGCAGAGTAGATGCATATTT
GSP1	Si15_257	CCCCAAGCCCTGCTCAAATG
GSP1	Si15_339	CGTCCGGATTTCGAAATGCAA

Die Primer wurden mit Primer3 aufgrund der vorhandenen Sequenz von dem Primerpaar Si15 erstellt.

Primer für die BAC-Enden

Klon	Primer	Primersequenzen
65O5	65O5aforw265	GCACACACACGAAAGCAGAT
	65O5arev428	CAGATGCGGTACGTCCTTTT
	65O5arev488	CCCCTAGGGCAAAAATGAAT
	65O5aforw481	CCTAGGGGCAACACCATCTA
	65O5arev706	CCTTCGCCAACTACCTTTGA
76K12	76K12aforw163	CAAGAATCTGACCCGCAAGT
	76K12arev412	AAAAGGGGACAAAATTTCCA
	76K12aforw97	TGTGCTTTGTGATTTGTGATGA
	76K12arev265	CTCCCCAATTCTCTGATACCC
64A21	64A21afor142	TGGTTTACCCTGCCAACATT
	64A21arev539	GTGGAGACTGCCTGGGATTA
	64A21aforw26	GGGGGATGATTAAGAGGATCA
	64A21arev422	AGCCACTGGAGACTTGCATT
65F8	65F8bforw402	AAAGCCGGATCCTGTTTATG
	65F8brev706	CACAACAAAAGGACGCATTG
	65F8bforw687	CAATGCGTCCTTTTGTGTG
	65F8brev809	AGGTCGTGCAGAGCTGATTT
65O5	65O5bforw146	TGTTCTCCTTTCCGGTTACACG
	65O5brev389	GACGTCCGCTTCAGAATCC
	65O5bforw264	CCTGCACACACCGCACTAT
	65O5brev552	CAGAAACCGGCAATCTCG
	65O5brev284	ATATAGTGCGGTGTGTGCAG
64A21	64A21bforw458	TGGTGGTGGACAAATGAAAA
	64A21brev609	GCATGTCCAATGAGAGCAGA
	64A21bforw590	TCTGCTCTCATTGGACATGC
	64A21brev842	TCTTGCAAAGACCGAAAACA

Die Primer wurden mit Primer3 nach erfolgter Ansequenzierung der BAC-Klon-Enden erstellt.

Primer zur T x E Referenzkarte

Genbez. aus TxE Karte	Primer	Primersequenzen
Primer aus Prunus Si-Seq.	Te1	TGTCTACTCTGCCTCCACCA
		GGAATTCTTCACTGCCTGGA
PP_LEa0014019f	Te2	AAGAATTTGGCGTGGATGAC
		GAAGATCCATGGCAGGAAAA
PP_LEa0010K05f	Te3	GCCTTTCAGCTTGCAAAGA
		TTTACGATCCAACCGACCAG
PP_LEa0013F14f	Te4	GAGAAGTGTTGGGAATCAATCA
		ATGCCTTCAGCTGCCATAAC
PP_LEa0019N24	TE5f	ATGATGGCAGCTGGAAAATC
	TE5r	CAATCAGCTTTGTTGGCAGA
PP_LEa0019N24	TE5f	ATGATGGCAGCTGGAAAATC
	TE6r	AAGCCACTGGCAAAACAATC
PP_LEa0019N24	TE6f	GCAGCTGGAAAATCTGGAAG
	TE6r	AAGCCACTGGCAAAACAATC
PP_LEa0010H23f	TE7f	TTTTCAAACCTTGCTGGAG
	TE7r	CCCATTGCCATCAAGTTGTC
PP_LEa0010H23f	TE8f	TCCTTTTCAAACCTTGCTG
	TE7r	CCCATTGCCATCAAGTTGTC
PP_LEa0014K15f	TE9f	TCCTAAATGCCAAGCGTACA
	TE9r	GAGGCCTTTCATTGTTCTG
PP_LEa0014K15f	TE10f	TACCCCAAATTTCAACCAA
	TE10r	GGATTCAGACAACAAGGATGC
PP_LEa0028D19f	TE11f	AATGCCAACAATTGGGAAAA
	TE11r	TCCAAGGAAGAATTGGTTCG
PP_LEa0028D19f	TE12f	AGGTCCTCAAATGCCAACA
	TE11r	TCCAAGGAAGAATTGGTTCG
PP_LEa0028D19f	TE13f	CCAGGAAGTTCCAATTCAGG
	TE13r	TTGGACATCAAGGAGGCTTT
PP_LEa0014O19f	TE14f	ATTGCATTGGTTCAGCCTTC
	TE14r	GAAGATCCATGGCAGGAAAA
PP_LEa0014O19f	TE14f	ATTGCATTGGTTCAGCCTTC
	TE15r	GATGTGCCACTCCAATGATG
PP_LEa0010K05f	TE16f	TTGAGGCGATTGTTTTACCC
	TE16r	AACCGACCAGAACGCATAAG
PP_LEa0010K05f	TE16f	TTGAGGCGATTGTTTTACCC
	TE17r	AGGATCGAGGATGTCAGCAC
PP_LEa0010K05f	TE18f	ATTGGAGGACTGGAGAAGCA
	TE16r	AACCGACCAGAACGCATAAG
PP_LEa0010K05f	TE18f	ATTGGAGGACTGGAGAAGCA
	TE19r	CCGGTCATCGCTACTAAAGC
PP_LEa0009M17f	TE20f	ATTCTGGTGAGAGGCGTGTT
	TE20r	ACCCAATGGGAAATACACA
PP_LEa0009M17f	TE21f	GTGTGCTCAGGCTGAAGGAT
	TE20r	ACCCAATGGGAAATACACA
PP_LEa0009M17f	TE22f	TGATAGATGCGCTTCTCAA
	TE22r	GGCCTCATAATGCAGGGTAA

PP_LEa0009M17f	TE21f	GTGTGCTCAGGCTGAAGGAT
	TE23r	GTCGGTGGTCTCTGACCAGT
TE19N24f	TE24	CAAGGTGGTGCCCAATTAAC
TE19N24r		TTGATTCAGAGGGTTGCACA
TE19N24f2	TE25	CTCTCAACAGCAGCACCAAC
TE19N24r2		AAGCCACTGGCAAAACAATC
TE19N24f2	TE26	CTCTCAACAGCAGCACCAAC
TE19N24r3		TTGATTCAGAGGGTTGCACA
PP_LEa0002N07f	TE27f	TGGGAATCATGGATCCAAC
	TE27r	ATCTCTTGCCAAAGCGGTAA
	TE27f	TGGGAATCATGGATCCAAC
	TE28r	CCAGCAACGAATCATTCTCA
	TE28f	AAGAGCTTGGGAATCATGGA
	TE27r	ATCTCTTGCCAAAGCGGTAA
	TE28f	AAGAGCTTGGGAATCATGGA
	TE28r	CCAGCAACGAATCATTCTCA
PP_LEa0010I01f	TE29f	GATGGCAAAGGAGAACGAAG
	TE29r	AGCCTTGCTCTCCAACCTCAGA
	TE31f	CCGTCAATGGAGACGATACA
	TE31r	GGCGCCACATATGATAGGAT
	TE29f	GATGGCAAAGGAGAACGAAG
	TE31r	GGCGCCACATATGATAGGAT
	TE31f	CCGTCAATGGAGACGATACA
	TE29r	AGCCTTGCTCTCCAACCTCAGA
	TE30f	CTTTTCGATGGCAAAGGAGA
	TE29r	AGCCTTGCTCTCCAACCTCAGA
	TE30f	CTTTTCGATGGCAAAGGAGA
	TE31r	GGCGCCACATATGATAGGAT
PP_LEa0008M15f	TE32f	ATGGAGGGGAGAATGGTTTC
	TE32r	CCCATCGTCAGAAAACCTCGT
	TE33f	CCGTCTGCAAGCCAAAATAC
	TE32r	CCCATCGTCAGAAAACCTCGT
	TE34f	TATGTTTGATCCCCGTCTGC
	TE32r	CCCATCGTCAGAAAACCTCGT
PP_LEa0004K10f	TE35f	AGGTTCTCCAGCCTCCTCTC
	TE35r	GGGGAAGGTGAGCAGTTTTT
	TE36f	TTTCCTCTCTGCAACCAACC
	TE35r	GGGGAAGGTGAGCAGTTTTT
	TE36f	TTTCCTCTCTGCAACCAACC
	TE37r	TCCAGAGACAAGGCAAGCTC
	TE35f	AGGTTCTCCAGCCTCCTCTC
	TE37r	TCCAGAGACAAGGCAAGCTC
	TE38f	CAACCAACCATGCTTCTCAA
	TE35r	GGGGAAGGTGAGCAGTTTTT
	TE38f	CAACCAACCATGCTTCTCAA
	TE37r	TCCAGAGACAAGGCAAGCTC
	TE38f	CAACCAACCATGCTTCTCAA
	TE38r	GGGGAAGGTGAGCAGTTTTT
PP_LEa0003D12f	TE39f	TTGGAGGACGAGCTTCCAAC

	TE39r	CCCGACAAACCAGATCAAGA
	TE40f	AAGGTGAAGGAAGGACAGCA
	TE40r	AAAAGCCAACCTGCTCCAC
	TE39f	TTGGAGGACGAGCTTCAACT
	TE40r	AAAAGCCAACCTGCTCCAC
	TE40f	AAGGTGAAGGAAGGACAGCA
	TE39r	CCCGACAAACCAGATCAAGA
PP_LEa0027N06f	TE41f	CCAGACGTGGTTTCCAACCTT
	TE41r	TTGGATATGGAGCACGTGAA
	TE42f	GAAAAACCGTTCAACCCAGA
	TE42r	TGGAGCACGTGAATCAAGAA
	TE43f	CGATGACTCTCAGGTTGCTG
	TE43r	TGACAGAATCTGGGCTGATG
	TE41f	CCAGACGTGGTTTCCAACCTT
	TE42r	TGGAGCACGTGAATCAAGAA
	TE41f	CCAGACGTGGTTTCCAACCTT
	TE43r	TGACAGAATCTGGGCTGATG
	TE42f	GAAAAACCGTTCAACCCAGA
	TE41r	TTGGATATGGAGCACGTGAA
	TE42f	GAAAAACCGTTCAACCCAGA
	TE43r	TGACAGAATCTGGGCTGATG
	TE43f	CGATGACTCTCAGGTTGCTG
	TE41r	TTGGATATGGAGCACGTGAA
	TE43f	CGATGACTCTCAGGTTGCTG
	TE42r	TGGAGCACGTGAATCAAGAA

Die Primer wurden anhand von Sequenzen aus der TxE-Referenzkarte (GDR-Website; Genome Database of Rosaceae) mit Primer3 erstellt. Es wurden jeweils mehrere Primerpaare für eine TxE-Sequenz erstellt.

Weitere Primersequenzen

Primer	Sequenz	Hersteller
M13-forw	GTAAAACGACGGCCAGT	MWG Biotech
M13-rev	CAGGAAACAGCTATGAC	MWG Biotech
Actin forw	CGAGGAAGATCTGGCATCA	Metabion
Actin rev	AGGAGCTGCTCTTGGCAGT	Metabion



A Unified Genetic Map of Roses

Introduction: The aim of this project is to develop a unified genetic map for di- and tetraploid roses. For this purpose we integrate markers for interesting floral traits like scent, ethylene sensitivity, self incompatibility and others in the diploid mapping population 94/1 (YAN et al. 2005) and 97/7 (LINDE et al. 2006). Primer sequences were achieved from Mibus et al. (unpublished) for ethylene sensitivity, all others from cloned genes out of databases. We first analyzed scent associated genes *Rosa hybrida* o-methyltransferases 1 and 2 (RhOoMT1+2) and *Rosa chinensis* o-methyltransferases Rcomt2 and 3, GermacrenD-Synthase (RhGDS), eugenol o-methyltransferase Rcomt1 and an alcohol acyl transferase RhAAT1. Second, we analyzed ethylene sensitivity associated genes RhETR1 to 4; RhACS1 to 5 and RhCTR1 and 2; RhEIN3, RhEIL and RhERF1. The amplified fragments were verified via sequencing and BLAST-search.

This work is a cooperation between the Hebrew University of Jerusalem, Rehovot, Israel and the University of Hannover, Institute of Plant Genetics.

Generating CAPS	Generating SSCPs	Verification
<p>Two different o-methyltransferases are known for <i>Rosa hybrida</i>. Both were amplified in population 94/1 and the parental plants.</p> <p>Figure 1: RhOoMT1 Mbol restriction digest of 94/1 parents and several individuals of the offspring, red arrows mark polymorphisms</p> <p>Figure 2: RhOoMT2 Mbol restriction digest of 94/1 parents and several individuals of the offspring</p> <p>Restriction digest with Mbol resulted in different band patterns between the parents 93/1-117 and 93/1-119 and their offspring in both RhOoMT1 and 2 amplified fragments. The markers segregate in Mendelian manner 1:1. All other screened PCR products showed no polymorphisms.</p>	<p>SSCP-markers were developed for ethylene sensitivity: ACC-Synthase genes 1, 2 and 3, ethylene receptor genes 2 and 3 and cytoplasmatic receptor 2. Also for one scent associated gene, the GermacrenD-Synthase, and primer pair Rcomt1.</p> <p>Figure 3: SSCP-gel from the PCR-products of the different primers for ethylene sensitivity (Population 94/1)</p> <p>Figure 4: SSCP- gel of PCR product for GermacrenD-Synthase, 94/1 parents and several individuals of the offspring</p> <p>GermacrenD-Synthase, RhETR2 and 3, RhCTR2 and RhACS5 segregate 1:1, RhACS3 segregates 1:3.</p>	<p>All developed markers were verified via sequencing as fragments truly belonging to the original sequences except the fragment amplified using primer pair for Rcomt1.</p> <p>For <i>Rosa hybrida</i> o-methyltransferases seven different alleles were identified. These alleles only differ in a few bases. The RhAAT1 fragments show only one SNP between both parents. Up to now no SNPs were detected for Rhomt2 and 3.</p> <p>Figure 5: Alignment for RhAAT1 with only one single base exchange</p>

Construction of the Genetic Linkage Map



Independent parental map construction was performed with JOINMAP, version 3.0 (STAM and VAN OOIJEN 1995). A LOD threshold of 5.0 was used to create linkage groups with the mapping function of Kosambi. The basic order for calculating linkage groups was adopted from the map of YAN et al. (2005).

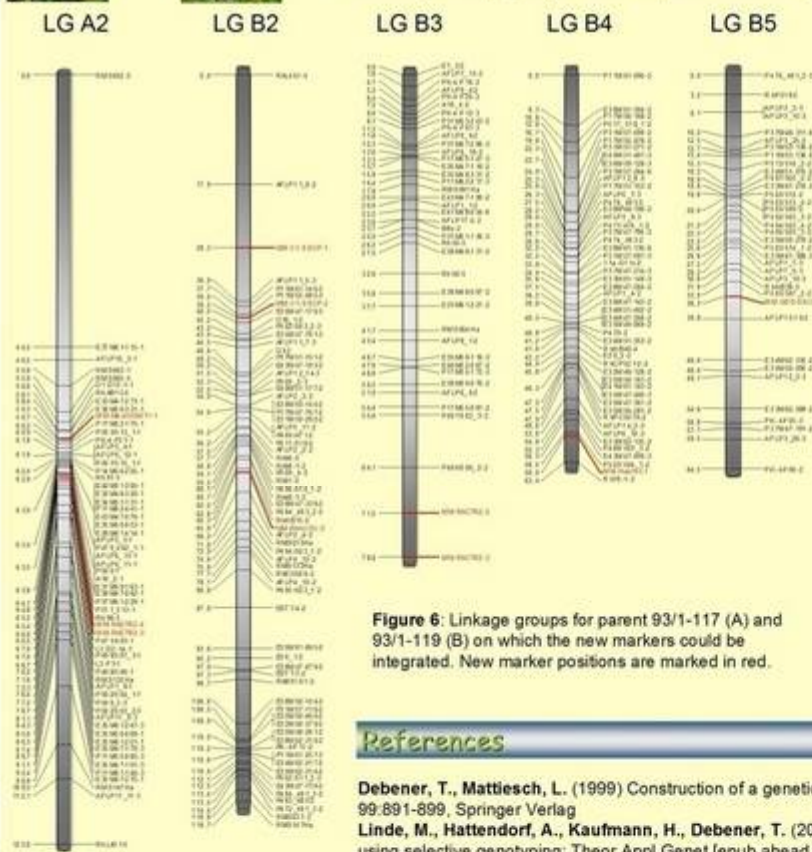


Figure 6: Linkage groups for parent 93/1-117 (A) and 93/1-119 (B) on which the new markers could be integrated. New marker positions are marked in red.

In total we were able to integrate 10 new markers on the map. They are spread over five linkage groups.

For ethylene reception linked markers comparable results were found in *Arabidopsis*.

RhCTR2 gene was located at the end of linkage group B3. The other ethylene reception linked genes were found in centromeric position of A2 (RhETR2) and B2 (RhACS5). Two scent associated genes were found near the centromeric region of linkage group A2 (MboOoMT1) and B5 (GDS-SSCP).

Outlook

Here we present first results of mapping scent and ethylene sensitivity genes in roses. Mapping results will be stabilized by analyzing the phenotypic characteristics. GC-Analysis of scent components and investigations of shelf life are in progress. For self incompatibility the SI-Proteins will be isolated and sequenced for primer generation. Future work will be to integrate more markers directly linked to morphological characters into the map.

References

Debener, T., Mattiesch, L. (1999) Construction of a genetic linkage map for roses using RAPD and AFLP markers, *Theor Appl Genet* (1999) 99:891-899, Springer Verlag
 Linde, M., Hattendorf, A., Kaufmann, H., Debener, T. (2006) Powdery mildew resistance in roses: QTL mapping in different environments using selective genotyping; *Theor Appl Genet* [pub ahead of print]
 Yan, Z., Denneboom, C., Hattendorf, A., Dolstra, O., Debener, T., Stam, P., Visser, P. B. (2005) Construction of an integrated map of rose with AFLP, SSR, PK, RGA, RFLP, SCAR and morphological markers, *Theor Appl Genet* (2005) 110: 766-666

Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Debener, dem Leiter des Institutes für molekulare Pflanzenzucht der Leibniz Universität Hannover für die Überlassung des Themas und die sehr gute Betreuung bedanken. Die Diskussionen waren stets hilfreich und haben nicht selten meine Motivation durch neue Ideen gesteigert.

Herrn Dr. Heiko Mibus-Schoppe danke ich für die Unterstützung rund um das Thema Ethylen und der Möglichkeit im Institut für Zierpflanzen- und Gehölzwissenschaften der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover die Versuche zur Haltbarkeit von Rosen durchzuführen.

Allen Kollegen, besonders Herrn Klaus Dreier für die Kreuzungsversuche, Frau Dr. Helgard Kaufmann für ihre Unterstützung bei der BAC-Analyse, Herrn Dr. Marcus Linde für die Unterstützung bei der QTL-Kartierung, Ingrid Robotta, Dörthe Musmann und Bettina Winnat für ihre Unterstützung im Laboralltag möchte ich danken. DANKE!

Besonderen Dank auch an die lieben „Korrektur-Leser/innen“, Anja Möhring, Heike Czuidej, Bettina Winnat und ganz besonders Sylvia Bach, für die vielen Ratschläge zur Verfassung meiner Arbeit.

Und nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Oma Gerda Hoffmann, meiner Tante Eva-Maria Sterthues und meinem Onkel Klaus Sterthues für ihre Geduld und Unterstützung bedanken. Ich bin sicher, dass ich es ohne euch nie geschafft hätte!!!

Zum Abschluß danke ich Hjassi und Peanut für die viele Freude jeden Tag.

Erklärung

gem. § 6 (5) Nr. 1-3 PromO

Ich erkläre, dass ich

1. die Arbeit ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe,
2. keine anderen, als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe
und
3. die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche
kenntlich gemacht habe.

Persönliche Daten

Manuela Bretzke

Geburtsdatum und –ort: 10. Febr. 1975 in Hannover

Werdegang

- | | |
|------------------------|---|
| März 2006 - heute | Doktorandin
Leibniz Universität Hannover
Institut für Pflanzengenetik, Abt. Molekulare
Pflanzenzucht

Aufgaben: Kartieren von Molekularen Markern für
Haltbarkeit und Selbstinkompatibilität in der Genkarte
von Rosen. Abgabe der Promotionsarbeit Juni 2009 |
| Dez. 2004 – Febr. 2006 | Wissenschaftliche Angestellte
Medizinische Hochschule Hannover
Abteilung Anatomie I

Aufgaben: Protein- und Glykoanalytik von Pregnancy-
associated-Glycoproteinen vom Rind |
| Okt. 1999 – Juli 2001 | Wissenschaftliche Hilfskraft
Universität Hannover
Fachbereich Physik

Aufgaben: Mentoren- und Tutorentätigkeiten, u. a.
Betreuung von Grundpraktika mit dem Schwerpunkt
Thermodynamik |
| Okt. 1998 – Febr. 2004 | Studium der Biologie
Universität Hannover, Abschluss: Diplomprüfung |
| Aug. 1995 – Juni 1998 | Vorbereitung zum Abitur
Hannover Kolleg, Abschluss: Hochschulreife |
| Aug. 1992 – Juni 1995 | Ausbildung zur Bürokauffrau
Bürobedarf und Büromöbel
Heinrich Trenzinger GmbH & Co KG, Hannover,
Abschluss: IHK-Prüfung |