

**Genetischer und molekularer Vergleich
verschiedener Formen der männlichen Sterilität
als Beitrag zur Etablierung von Hybridzuchtverfahren**

- *Allium schoenoprasum* L.: Eine Pflanze mit Modellcharakter -

Vom Fachbereich Gartenbau
der Universität Hannover
zur Erlangung
des akademischen Grades eines

Doktors der Gartenbauwissenschaften
- Dr. rer. hort. -

genehmigte
Dissertation

von
Dipl.-Ing. agr. Thomas Engelke
geboren am 03.12.1968 in Holzminden

1999

Referent: Prof. Dr. Turan Tatlioglu

Korreferent: Prof. Dr. Dr. h.c. Wolfgang Friedt

Tag der Promotion: 16.02.1999



Vincent van Gogh, *Topf mit Schnittlauch*

VON DER ENTSTEHUNG DER GESCHLECHTER:

"Empedokles behauptet, daß männliche und weibliche Wesen entstanden seien, je nach dem Einfluß von Wärme oder Kälte. Daher werde berichtet, daß die ersten männlichen Wesen mehr im Osten und Süden aus der Erde entstanden seien, die weiblichen mehr im Norden."

AETIUS V,7

Kurzfassung

Genetischer und molekularer Vergleich verschiedener Formen der männlichen Sterilität als Beitrag zur Etablierung von Hybridzuchtverfahren - *Allium schoenoprasum* L.: Eine Pflanze mit Modellcharakter -

Die kerngenetischen männlichen Sterilitätsfaktoren *wi*, *st1* und *st2* zeigen nichtallelische, monogen rezessive Vererbung in ihren ursprünglichen Cytoplasmen. Diese neuen Sterilitäten wurden im Hinblick auf eventuell vorhandene cytoplasmatische Erbfaktoren charakterisiert. Durch RFLP-Analysen mit mitochondrialen Gensonden erfolgte zunächst ein Vergleich cytoplasmatisch männlich steriler (CMS) und restorierter Genotypen des bekannten CMS-Systems mit Pflanzen der *wi*-, *st1*- und *st2*-Sterilität sowie mit fertilen Pflanzen verschiedener Herkünfte. Neben dem (S)-Cytoplasma des CMS-Systems wurden vier weitere Cytoplasmen differenziert. Eine mögliche Funktion des *atp9*-Gens bei der Bildung der verschiedenen Cytoplasmatypen wird unter Berücksichtigung der Entstehung bekannter CMS-Sequenzen von anderen Pflanzenarten diskutiert.

Die Unterscheidung von cytoplasmatischer (CMS) und genischer (GMS) männlicher Sterilität wurde durch eine gezielte Einlagerung der kerngenetischen Sterilitätsfaktoren in die verschiedenen Cytoplasmatypen erreicht. Während *wi* und *st1* in vier verschiedenen Cytoplasmatypen ausgeprägt werden, bedingt das Gen *st2* nach Einlagerung in ein anderes Cytoplasma keine männliche Sterilität. Folglich sind *wi* und *st1* GMS-Formen, während an der Ausprägung der *st2*-Sterilität ein cytoplasmatischer Erbfaktor beteiligt ist. Dieser wurde durch reziproke Kreuzungen verifiziert und das CMS-System durch Selektion von Maintainer-Genotypen vervollständigt. Im Gegensatz zu dem früher beschriebenen CMS-System wird keine der neuen Sterilitäten durch hohe Temperaturen oder Tetracyclin beeinflusst. Vorteile des neuen CMS-Systems für die praktische Pflanzenzüchtung und die Vor- und Nachteile von Umwelteinflüssen auf die Expression der männlichen Sterilität werden diskutiert.

Die Sterilität der neuen CMS entsteht durch einen funktionellen Schaden des sporophytischen Gewebes, während die Mikrosporogenese normal verläuft. Bei der *wi*- und *st1*-Sterilität kommt die Mikrosporogenese im Tetradenstadium zum Stillstand, begleitet von einer Hypertrophie des Tapetums. Während bei *wi*-sterilen Pflanzen die Kallosehülle der Mikrosporen noch abgebaut wird, fehlt dieser Abbau bei der *st1*-Sterilität.

Molekulare Untersuchungen bestätigten die maternale Vererbung der Mitochondrien. Die mitochondriale Genomorganisation scheint nicht durch die kerngenetischen Sterilitätsfaktoren beeinflusst zu werden.

Zwei mitochondrial kodierte Proteine unterscheiden sich bei dem sterilitätsinduzierenden Cytoplasma des neuen CMS-Systems (16,8 und 4,6 kDa) im Vergleich zu den Normalcytoplasmen (17,8 und 4,4 kDa). Das kleinere Protein ist das Produkt des *atp9*-Gens. Das Restorer-gen *St2/st2* und das GMS-Gen *Wi/wi* beeinflussen die Translation der mitochondrial kodierten Proteine in den untersuchten Organen (Wurzeln und Laub) nicht. Im Laub wird ein zusätzliches Protein (27 kDa) im Vergleich zu den mitochondrial kodierten Proteinen der Wurzel gebildet.

Zur weiteren Charakterisierung der temperaturabhängigen Fertilitätsrestoration des früher beschriebenen CMS-Systems wurden mittels nichtradioaktivem Differentiell Display unterschiedlich exprimierte mRNAs in sterilen und restorierten Klonteilen eines temperatursensitiven Genotyps nachgewiesen. Diese Arbeiten sollen die Grundlage zur Isolierung des temperatursensitiven Restorer-gens legen.

Abstract

Genetic and molecular comparison of different forms of male sterility, making a contribution to the establishment of hybrid-breeding methods - *Allium schoenoprasum* L.: A plant with model qualities -

The nuclear sterility factors *wi*, *st1* and *st2* showed a nonallelic, monogenic recessive inheritance in their original cytoplasms. These new male sterilities were further characterised with respect to cytoplasmic factors which might be causally related to them. Cytoplasmic male sterile (CMS) and restored genotypes of the known CMS-system are compared with plants of the *wi*-, the *st1*- and the *st2*-sterility and additional fertile plants of different origin by means of RFLP-analyses using mitochondrial gene probes. Besides the (S)-cytoplasm of the CMS-system, four additional cytoplasms have been distinguished. There is consequently a high degree of variability of the mitochondrial genome in chives. A possible function of the *atp9*-gene in generating the different cytoplasm types is discussed in relation to the origin of known CMS-sequences in other plant species.

The differentiation of cytoplasmic (CMS) and genic (GMS) male sterility was achieved by a specific transfer of the nuclear male sterility factors to the different cytoplasm types. While *wi* and *st1* are expressed in four different cytoplasm types, *st2* does not show itself in a cytoplasm type differing from the original. Therefore, *wi*- and *st1*-sterilities are GMS, but a cytoplasmic factor is needed for the occurrence of the *st2*-sterility. This cytoplasmic factor was verified by reciprocal crosses and the CMS-system was completed by the selection of maintainer genotypes. In contrast to the previously described CMS-system, none of these new sterilities were affected by high temperatures or tetracycline. The benefits of a new CMS-system to practical breeding and the advantages and disadvantages of the environmental effects on the expression of male sterility are discussed.

In contrast to the other male sterilities investigated, the microsporogenesis in the plants of the new CMS-system is not altered but the male sterility is caused by a functional damage of the sporophytic tissues. In *wi* and *st1*-sterile plants the microsporogenesis is stopped during the tetrad stage of the microspores, accompanied by hypertrophy of the tapetum. While in *wi*-sterile plants the callose wall surrounding the microspores is broken down like in fertile plants, in *st1*-sterile plants the callose is left over.

The maternal inheritance of mitochondria is confirmed by further molecular investigations. The mitochondrial genome organisation seems not to be altered by the nuclear sterility factors.

Two mitochondrial encoded proteins of the sterility inducing cytoplasm of the new CMS differ in size (16.8 and 4.6 kDa) from the corresponding proteins in normal cytoplasm types (17.8 and 4.4 kDa). The smaller protein is the product of the *atp9* gene. The restorer gene *St2/st2*, as well as the GMS-gene *Wi/wi*, does not affect the translation of the mitochondrial proteins in the investigated organs (roots and leaves). An additional mitochondrial protein (27 kDa) is expressed in the leaves when compared to the proteins which are expressed in the mitochondria derived from roots.

For further characterisation of the fertility restoration depending on high temperatures in the previously described CMS-system, differences in the transcript patterns of sterile and restored clones of a temperature sensitive genotype are detected by means of nonradioactive differential display. The isolation of the temperature sensitive restorer gene should be possible on the basis of these investigations.

Schlagwörter

Schnittlauch, Männliche Sterilität, Mitochondrien

Key words

Chives, male sterility, mitochondria

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	17
2	GRUNDLAGEN DES ENTWICKLUNGSPROZESSES DER BLÜTEN- ORGANE HÖHERER PFLANZEN	23
2.1	Einleitung	23
2.2	Material und Methoden	24
2.2.1	Pflanzenmaterial	24
2.2.2	Färbetechniken für cytologische Untersuchungen der Mikrosporogenese	26
2.3	Ergebnisse	26
2.3.1	Der Mikrosporogeneseverlauf bei der <i>wi</i> -, <i>st1</i> - und <i>st2</i> -Sterilität im Vergleich zu fertilen Schnittlauchpflanzen	26
2.4	Diskussion	31
2.4.1	Einordnung der männlichen Sterilitäten in die Entwicklungsstadien der Blütenbildung.....	31
2.4.2	Die Bedeutung von CMS und GMS für die Evolution	32
3	VARIABILITÄT DER MITOCHONDRIALEN GENOMORGANISATION ALS VORAUSSETZUNG FÜR DIE ENTSTEHUNG VON NORMAL- UND STERILITÄTS-CYTOPLASMEN	35
3.1	Einleitung	35
3.2	Material und Methoden	43
3.2.1	Pflanzenmaterial	43
3.2.2	Isolierung von Gesamt-DNA, Restriktion, Agarose-Gelelektrophorese und Blotting.....	44
3.2.3	Beschreibung der heterologen mitochondrialen Gensonden.....	46
3.2.4	Transformation von <i>Escherichia coli</i> , Klonierung und Isolierung der Inserts	47
3.2.5	Radioaktive Markierung, Southern-Hybridisierung und Autoradiographie.....	49
3.3	Ergebnisse	49
3.3.1	Nachweis von fünf Cytoplasmotypen, die sich bezüglich ihrer mitochondrialen Genomorganisation unterscheiden.....	49
3.4	Diskussion	53
3.4.1	Der methodische Ansatz	53
3.4.2	Die Variabilität des mitochondrialen Genoms vom Schnittlauch im Vergleich zu anderen Pflanzenarten	55
3.4.3	Übereinstimmungen bei der Entstehung von CMS-Sequenzen in verschiedenen Pflanzenarten	57

4	KLASSISCH GENETISCHER NACHWEIS VON CMS UND GMS DURCH EINLAGERUNG KERNGENETISCHER STERILITÄTSFAKTOREN IN VERSCHIEDENE CYTOPLASMATYPEN	63
4.1	Einleitung.....	63
4.2	Material und Methoden.....	64
4.2.1	Pflanzenmaterial.....	64
4.2.2	Durchführung der Kreuzungen.....	65
4.2.3	Bonitur der Blüten.....	66
4.2.4	Statistische Auswertung.....	66
4.3	Ergebnisse.....	68
4.3.1	Bestätigung der monogen rezessiven Vererbung der kerngenetischen Sterilitätsfaktoren w_i , $st1$ und $st2$ in ihren Ursprungcytoplasmen (1), (2) bzw. (5).....	68
4.3.2	Komplementationstests.....	69
4.3.3	Analyse der für die Einlagerung der kerngenetischen Sterilitätsfaktoren verwendeten Mutterpflanzen.....	69
4.3.4	Analyse des kerngenetischen Sterilitätsfaktors w_i nach Einlagerung in die Cytoplasmen (3) und (5).....	73
4.3.5	Analyse des kerngenetischen Sterilitätsfaktors $st1$ nach Einlagerung in die Cytoplasmen (1), (3) und (5).....	74
4.3.6	Analyse des kerngenetischen Sterilitätsfaktors $st2$ nach Einlagerung in das Cytoplasma (1).....	78
4.4	Diskussion.....	80
4.4.1	Der methodische Ansatz.....	80
4.4.2	Nachweis der genischen männlichen Sterilitätsform (GMS) bei W_i/w_i und $St1/st1$	80
4.4.3	Nachweis einer neuen CMS: (5) $st2 st2$	81
4.4.4	Nachweis einer neuen rezessiv vererbten Sterilität mit Temperaturreaktion.....	81
5	BEDEUTUNG UND NUTZUNGSMÖGLICHKEITEN DER UMWELT-VARIABILITÄT BEI CMS- UND GMS-SYSTEMEN	85
5.1	Einleitung.....	85
5.2	Material und Methoden.....	88
5.2.1	Pflanzenmaterial.....	88
5.2.2	Tetracyclinapplikation.....	88
5.2.3	Variation der Temperaturbedingungen.....	88
5.2.4	Erfassung des Blütezeitpunktes.....	88
5.3	Ergebnisse.....	89
5.3.1	Boniturdaten.....	89
5.3.2	Variabilität des Blütezeitpunktes in den untersuchten Nachkommenschaften.....	92
5.3.3	Stabilität in der Ausprägung der w_i - und der $st1$ -GMS.....	95
5.3.4	Stabilität in der Ausprägung der CMS (5) $st2 st2$	95

5.4	Diskussion.....	95
5.4.1	Nutzungsmöglichkeiten der Umweltvariabilität in CMS- und GMS-Systemen.....	95
5.4.2	Nutzungsmöglichkeiten stabiler CMS- und GMS-Systeme.....	100
6	DER EINFLUß VON KERNGENEN AUF DIE MITOCHONDRIALE GENOMORGANISATION UND DIE KONSTANZ DER MATERNALEN VERERBUNG DES CYTOPLASMAS.....	109
6.1	Einleitung.....	109
6.2	Material und Methoden.....	112
6.2.1	Pflanzenmaterial.....	112
6.2.2	Methoden.....	112
6.3	Ergebnisse.....	113
6.3.1	Konstanz der maternalen Vererbung der Mitochondrien in verschiedenen Kernhintergründen und unter Berücksichtigung der GMS-Gene <i>Wi/wi</i> und <i>St1/st1</i> sowie des Restorergens <i>St2/st2</i>	113
6.4	Diskussion.....	115
6.4.1	Der methodische Ansatz.....	115
6.4.2	Die Vererbung der Mitochondrien beim Schnittlauch im Vergleich zu anderen Spezies.....	116
6.4.3	Einfluß von GMS-Genen auf die mitochondriale Genomorganisation.....	118
6.4.4	Einfluß von Restorergenen auf die mitochondriale Genomorganisation.....	118
7	DIE MITOCHONDRIAL KODIERTEN PROTEINE VERSCHIEDENER CYTOPLASMATYPEN UND IHRE BEEINFLUSSUNG DURCH RESTORER- UND GMS-GENE.....	119
7.1	Einleitung.....	119
7.2	Material und Methoden.....	121
7.2.1	Pflanzenmaterial.....	121
7.2.2	Kontaminationsfreie Aufzucht von Pflanzen <i>in vitro</i>	121
7.2.3	Isolierung intakter Mitochondrien.....	122
7.2.4	<i>In organello</i> Translation mit ³⁵ S-Methionin und ³⁵ S-Cystein.....	123
7.2.5	Polyacrylamid-Gelelektrophorese mitochondrialer Polypeptide.....	125
7.3	Ergebnisse.....	126
7.3.1	Gewebespezifische Expression eines mitochondrial kodierten Proteins im Laub im Vergleich zu den Wurzeln.....	126
7.3.2	Mitochondriale Expressionsunterschiede in dem neuen Sterilitätscytoplasma (5) im Vergleich zu den Normalcytoplasmen (1) und (2).....	128
7.3.3	Die mitochondriale Proteinbiosynthese bleibt von dem GMS-Gen <i>Wi/wi</i> unbeeinflusst.....	129
7.4	Diskussion.....	130
7.4.1	Der methodische Ansatz.....	130

7.4.2	Mitochondrial kodierte Proteine in genisch männlich sterilen und fertilen Pflanzen.....	131
7.4.3	Die Expression mitochondrial kodierter Proteine in cytoplasmatisch männlich sterilen und fertilen Pflanzen.....	132
7.4.4	Wie bewirken die CMS-spezifischen Veränderungen im mitochondrialen Translationsmuster die männliche Sterilität?.....	133
8	GRUNDLEGENDE ARBEITEN ZUR ISOLIERUNG DES TEMPERATUR-SENSITIVEN RESTORERGENS <i>T</i>	137
8.1	Einleitung.....	137
8.2	Material und Methoden.....	138
8.2.1	Pflanzenmaterial.....	138
8.2.2	RNA-Isolierung.....	138
8.2.3	DDRT-PCR (Differential Display Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction).....	139
8.2.4	Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	141
8.2.5	Visualisierung der Fragmente durch Silberfärbung.....	141
8.2.6	Reamplifikation und Klonierung polymorpher Fragmente.....	142
8.3	Ergebnisse.....	143
8.3.1	Nachweis differentiell exprimierter mRNAs eines Temperatur-sensitiven Genotyps unter normalen und hohen Temperaturbedingungen durch DDRT-PCR.....	143
8.4	Diskussion.....	145
8.4.1	Der methodische Ansatz.....	145
8.4.2	Die Wirkungsweise von Restorer genen in verschiedenen CMS-Systemen.....	147
8.4.3	Die Fertilitätsrestoration in den CMS-Systemen verschiedener <i>Allium</i> -Arten.....	150
9	ZUSAMMENFASSUNG	153
10	LITERATUR	155
11	ANHANG	177
12	DANKSAGUNG	187
13	LEBENS LAUF	189

Verzeichnis der Abkürzungen

soweit nicht im Text erklärt oder allgemein verständlich

A	Adenin
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Rinder-Serumalbumin
C	Cytosin
cpm	Counts per minute
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DDT	Dithiotreitol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz
EGTA	Ethylenglycol-bis-(β -Amino-Ethylether)N,N'-Tetraessigsäure
G	Guanin
GTP	Guanosin 5' Triphosphat
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
M	Molar
MBq	Megabequerel
mg	Miligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrimolar
ppm	Parts per Million
PVP-40	Polyvinylpyrrolidon
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Natriumsalz-Citrat
T	Thymin
TBq	Tausendbequerel
Temed	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	transfer Ribonukleinsäure
U	Uracil
xg	Erdbeschleunigung

Besondere Schreibweisen:

In der vorliegende Arbeit werden folgende germanisierte Fachausdrücke angelsächsischen Ursprungs verwendet:

Gene zur Wiederherstellung der Fertilität werden als "Restorergene" und kreisförmige mitochondriale DNA-Moleküle als "Cirkel" bezeichnet. Verwandte Ausdrücke sind diesen Schreibweisen angepaßt.

1 Einleitung

In einem Hybridzuchtprogramm werden zunächst durch den Aufbau vitaler Inzuchtlinien letale oder subletale Gene ausgemerzt. Bei vorliegender Kombinationseignung kann durch anschließende Kreuzung dieser Linien die Heterosis genutzt und somit eine leistungsstarke F_1 -Hybridsorte gezüchtet werden. Ein weiterer Vorteil der Hybridzüchtung gegenüber anderen Zuchtprogrammen besteht darin, dominant vererbte qualitative sowie quantitative Eigenschaften leicht kombinieren zu können. Insbesondere gilt dies für Merkmale, die in Repulsionskopplung vorliegen, wie beispielsweise die Resistenzgene gegen verschiedene Mehltaurassen beim Spinat (BRANDENBERGER et al. 1992). Einige Merkmale werden ausschließlich durch die heterozygote Konstitution der beteiligten Gene ausgeprägt, wie zum Beispiel Mischfarben oder bestimmte Blütenformen des Sternphlox (KUCKUCK 1979). Die Individuen einer Hybridsorte sind genetisch weitgehend identisch, so daß einheitliche Bestände erzielt werden. Dies ist besonders bei maschinell bearbeiteten Kulturen, im Vertragsanbau und bei Verpackung und Transport von Vorteil. Die Saatgutproduktion kann aufgrund des hohen Heterozygotiegrades in den Hybridsorten nur durch Kreuzung der Elternlinien erfolgen, so daß ein Nachbau nicht möglich, und folglich ein natürlicher Sortenschutz gegeben ist.

Bei der Herstellung einer Hybridsorte sind Befruchtungen des Saatgutelters durch eigenen Pollen zu verhindern, weil die Sorte sonst durch inzuchtgeschwächte Individuen verunreinigt wird. Dies kann in besonders effektiver Weise durch Nutzung männlich steriler Pflanzen geschehen. Sie bilden keine funktionsfähige Pollen oder setzen diese nicht frei, ihre Ovarien sind jedoch normal befruchtungsfähig, so daß männlich sterile Pflanzen züchtungstechnisch als rein weiblich betrachtet werden können. Der Abbruch der Pollenentwicklung erfolgt bei verschiedenen Sterilitätsformen während unterschiedlicher Entwicklungsstadien. Am Anfang der vorliegenden Arbeit werden deshalb die Grundlagen des Entwicklungsprozesses der Blütenorgane kurz beschrieben und die Entwicklungsstadien erfaßt, bei denen die hier untersuchten Sterilitätsformen in Erscheinung treten. Dabei wird auch auf die Bedeutung der männlichen Sterilität in natürlichen Populationen, also für die Evolution, eingegangen.

Aufgrund ihrer Vererbung werden zwei Sterilitätsformen unterschieden, die cytoplasmatische und die genische männliche Sterilität.

Cytoplasmatische männliche Sterilität (CMS)

Die CMS ist gekennzeichnet durch die Interaktion zwischen einem Sterilitätscytoplasma (S) und Restorer genen im Kern (Rf/rf), die meistens im dominanten Zustand die Fertilität wiederherstellen können. In der älteren Literatur wurde auch der Begriff genisch-

cytoplasmatische Sterilität verwendet, um eine Abgrenzung zu solchen Sterilitätsformen zu ermöglichen, bei denen noch keine Restorerogene gefunden wurden, und die folglich nur cytoplasmatisch bedingt zu sein scheinen. Neben dem (S)-Cytoplasma existiert ein weiterer Plasmotyp (N), der unabhängig von der Konstitution am Restorerlocus fertile Pflanzen bedingt. Unter der Voraussetzung einer konstant maternalen Vererbung des Cytoplasmas ist es möglich, durch Bestäubung einer sterilen Pflanze (S)*rfrf* mit einer Erhalterlinie (Maintainer: (N)*rfrf*) eine Nachkommenschaft zu erzeugen, die zu 100% aus männlich sterilen Pflanzen besteht und als Mutterlinie (A-Linie) in der Hybridzüchtung genutzt werden kann (Abb.1.1). Werden bei einer Kulturart die Samen oder Früchte geerntet, so ist es notwendig, daß die Restorerogene bei der Vaterlinie im dominanten Zustand vorliegen, um eine fertile Hybride zu erhalten. Werden dagegen nur die vegetativen Teile der Kultur genutzt, ist eine Restoration der Fertilität nicht notwendig.

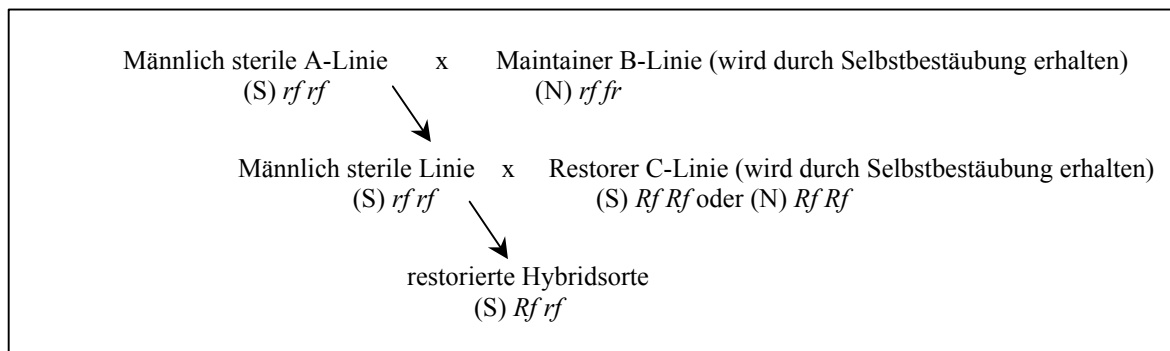


Abb. 1.1: Nutzung eines CMS-Systems zur Herstellung einer fertilen Hybridsorte.

Beim Schnittlauch konnte ein CMS-System etabliert werden, in das neben dem Restorerogen *X/x*, das im dominanten Zustand die Fertilität wiederherstellt (TATLIOGLU 1982), zwei weitere Gene involviert sind, die einen fertilitätsfördernden Einfluß haben. Das Gen *T/t* bedingt im dominanten Zustand eine Temperatursensitivität der CMS, die bei konstant hohen Temperaturen (24°C) zu fertilen Pflanzen führt (TATLIOGLU 1987). Somit handelt es sich bei dem *T*-Gen um ein Temperatur-sensitives Restorerogen. Das Gen *A/a* führt im rezessiven Zustand zu Tetracyclin-sensitiven CMS-Pflanzen, bei denen die Applikation einer Tetracyclinlösung etwa 14 Tage vor der Blüte die Fertilität fördert (TATLIOGLU und WRICKE 1988; RUGE et al. 1993). Sowohl die durch hohe Temperatur als auch die durch Tetracyclinbehandlung hervorgerufene Fertilität ist reversibel (TATLIOGLU 1985, 1986)

Durch molekularbiologische Untersuchungen von CMS-Systemen verschiedener Pflanzenarten wurde gezeigt, daß der cytoplasmatische Sterilitätsfaktor durch Umorganisationen im mitochondrialen Genom entsteht, in deren Folge sich Veränderungen im Transkriptions- und Translationsmuster der Mitochondrien ergeben. Bei restorierten Pflanzen wird oftmals die Synthese von zusätzlich gebildeten CMS-spezifischen mitochondrialen Proteinen durch die meist dominanten Restorerogene unterdrückt. Die Chloroplasten konnten als Erbträger der CMS ausgeschlossen werden, nachdem in fertilen somatischen Hybriden von

Nicotiana (BELLIARD et al. 1978), *Brassica* (PELLETIER et al. 1983) und *Petunia* (CLARK et al. 1985) das Chloroplastengenom des sterilen Elters und in sterilen Regeneraten das Chloroplastengenom des fertilen Elters nachgewiesen wurde.

Die Untersuchung der mitochondrial kodierten Proteine bei der CMS des Schnittlauchs ergab ein CMS-spezifisches 18kDa Polypeptid, dessen Synthese durch das dominante Restorer-gen *X/x* reduziert wird (POTZ und TATLIOGLU 1993). Die Tetracyclinsensitivität der CMS konnte ebenfalls geklärt werden. So wird wie in Bakterien und Hefen die gesamte Proteinbiosynthese der Mitochondrien durch Tetracyclin gehemmt. Sensitive Pflanzen, (S)*xxaa*, enthalten eine geringere Menge des CMS-spezifischen 18kDa Polypeptids, die durch die Behandlung unter einen Schwellenwert gedrückt wird, so daß die sterilitätsbedingende Wirkung verloren geht. Insensitive Pflanzen, (S)*xxA*., haben dagegen einen so hohen Gehalt des Polypeptids, daß der Schwellenwert durch die Behandlung nicht unterschritten wird (SCHNEIDER und TATLIOGLU 1994; TATLIOGLU et al. 1995). Bei Applikation höherer Tetracyclinkonzentrationen gehen die Pflanzen ein. Das Gen für die Tetracyclinsensitivität der CMS ist also ein unvollständig wirkendes Restorer-gen, das nur in Verbindung mit der Tetracyclinbehandlung phänotypisch zu fertilen Pflanzen führt. Die Wirkung der Temperaturbehandlung auf die mitochondriale Translation wurde ebenfalls untersucht. Der Gehalt des mitochondrialen 18kDa Polypeptids bei Temperatur-sensitiven und -insensitiven Pflanzen unter normalen Temperaturbedingungen (20°/12°C, Tag/Nacht) ist etwa gleich hoch. Die Synthese des Proteins wird nur bei Temperatur-sensitiven Genotypen, (S)*xxT*., unter hohen Temperaturen (konstant 24°C) gehemmt (SCHNEIDER und TATLIOGLU 1996a). Daraus ist zu folgern, daß das *T*-Gen nur unter hohen Temperaturen eingeschaltet wird, und es sich somit um ein Temperatur-sensitives Restorer-gen handelt.

Bezogen auf die molekularen Grundlagen der CMS, sind trotz der oben dargestellten Kenntnisse bis heute einige Fragen offen geblieben. So ist über die Funktion der zusätzlichen CMS-spezifischen mitochondrialen Proteine bisher wenig bekannt, und auch die molekularen Prozesse, die zur Beeinflussung der Mitochondrien durch das Kerngenom führen, sind weitgehend ungeklärt. Einige Kerngene können die Organisation mitochondrialer Gene verändern und somit bei Nachkommen zu anderen mitochondrialen Genomorganisationen führen, als aufgrund einer konstanten maternalen Vererbung zu erwarten wäre. Ein Beispiel in Verbindung mit der männlichen Sterilität ist das Restorer-gen von *Phaseolus vulgaris*, das die Elimination des die CMS-Sequenz tragenden "Chromosoms" aus dem mitochondrialen Genom bewirkt (MACKENZIE und CHASE 1990). Da die Konstanz der maternalen Vererbung des Cytoplasmas eine Voraussetzung für Kreuzungsanalysen zur Unterscheidung von CMS und GMS ist, werden im Rahmen dieser Arbeit diesbezügliche Versuche beim Schnittlauch angestellt und der Einfluß kerngenetischer Sterilitätsfaktoren auf die mitochondriale Genomorganisation untersucht.

Bei der Mehrzahl der untersuchten Pflanzenarten wirken die Restorerogene auf die mitochondriale Transkription oder Translation der CMS-Sequenzen. Die dabei ablaufenden molekularen Prozesse sind ungeklärt. Ein wesentlicher Beitrag zum Verständnis der molekularen Prozesse die zu CMS-Phänotypen und deren Restoration führen, ist durch die Isolierung von Restorerogenen zu erwarten. Bisher ist nur beim Mais mittels "transposon-tagging" die Isolierung eines Restorergens (*Rf2*) gelungen. Dieses Gen zeigt eine 70%ige Sequenzhomologie zu den Aldehyddehydrogenasen (CUI et al. 1996). Der Prozeß der Fertilitätsrestoration beim Mais ist dennoch ungeklärt (LEVINGS 1996). Das *Rf2*-Gen steht in komplementärer Wirkung zum *Rf1*-Gen (LAUGHNAN und GABAY-LAUGHNAN 1983), beeinflusst die Expression des CMS-spezifischen mitochondrialen Proteins aber im Gegensatz zu diesem nicht (DEWEY et al. 1987) und ist folglich nur bedingt mit den Restorerogenen anderer Pflanzenarten vergleichbar.

Auch die genetische Determination des Temperatureinflusses auf die Ausprägung der CMS ist nicht ausreichend geklärt worden. Dieser Einfluß kann sich bei manchen Pflanzenarten, wie z.B. beim Raps (FAN und STEFFANSON 1986; RENARD et al. 1998) sehr nachteilig auf die Hybridsaatgutproduktion auswirken, wenn es zu Befruchtungen innerhalb der A-Linie kommt. Umgekehrt muß bei den Hybriden eine stabile Restoration erfolgen, wenn Samen oder Früchte geerntet werden sollen. Ein aktuelles Beispiel für eine instabile Restoration ist die Roggenhybridsorte 'Farino' mit der nach einer fünfjähriger amtlichen Prüfung mit konstant hohen Leistungen im ersten Anbaujahr, 1998, bereits 15% der Roggenanbaufläche in der Bundesrepublik bestellt wurde. Es traten in diesem Jahr erhebliche Ertrags- einbußen (bis zu 80%) durch Schartigkeit (unbefruchteter Samenansatz) auf, in deren Folge hoher Mutterkornbesatz beobachtet wurde. Die Schartigkeit wird auf einen unzureichenden Pollenflug zurückgeführt (Presseinformation der Firma Lochow-Petkus vom 18.07.1998). Da andere Roggen-Hybridsorten keine entsprechenden Ausfälle gezeigt haben, ist zu vermuten, daß in der Sorte 'Farino' die Restoration der CMS nur unzureichend erfolgt ist. Die Ursache dafür könnten die ungünstigen Witterungsbedingungen während der Blüte in 1998 sein. In diesem Fall hätte in der Sorte 'Farino' eine unbewußte Selektion umweltabhängiger, wahrscheinlich Temperatur-sensitiver Restorerogene stattgefunden. Weitere molekulare Untersuchungen der Temperatursensitivität beim Schnittlauch sowie des betreffenden Gens können zum Verständnis der Fertilitätsrestoration und ihrer Umweltvariabilität auch bei CMS-Systemen anderer wirtschaftlich wichtiger Pflanzenarten beitragen. In der vorliegenden Arbeit werden aus den genannten Gründen grundlegende Arbeiten zur Isolierung des Temperatur-sensitiven Restorergens beim Schnittlauch durchgeführt.

Genische männliche Sterilität (GMS)

In der klassisch genetischen Analyse wurde bei der GMS kein maternal vererbter (also cytoplasmatischer) Faktor nachgewiesen, sie wird ausschließlich durch meistens rezessive

Kerngene bedingt. Um die Sterilität in der nächsten Generation zu erhalten, kann bestenfalls eine sterile Pflanze durch eine heterozygote bestäubt werden. In der Nachkommenschaft erfolgt eine Aufspaltung fertiler und steriler Pflanzen im Verhältnis 1:1. Die Erzeugung einer vollständig männlich sterilen Linie ist nicht möglich, und folglich sind der Nutzung dieser Sterilitätsform in der Hybridsaatguterzeugung Grenzen gesetzt. Anwendung findet die GMS zur Erzeugung von Hybridsaatgut hauptsächlich bei Zierpflanzen, besonders wenn die männliche Sterilität durch eine Umwandlung der Antheren in Blütenblätter bedingt ist, und somit gleichzeitig Blütenfüllung erreicht werden kann (z. B. bei *Tagetes* und *Zinnia*, KUCKUCK 1979). In der Regel ist aber die Selektion der sterilen Pflanzen aus einer spaltenden Nachkommenschaft sehr aufwendig. Die GMS kommt jedoch im Pflanzenreich etwa vier mal häufiger vor als die CMS (KAUL 1988). Bei einer Reihe von wichtigen Kulturpflanzen, wie z. B. der Tomate, dem Spinat oder Porree konnte bisher nur GMS nachgewiesen werden; bei anderen Arten (Weizen, Raps) befriedigen die vorhandenen CMS-Systeme in der Praxis aufgrund ihrer Instabilität oder aufgrund von Kopplung mit unerwünschten Eigenschaften nicht. Die Züchtung von Hybridsorten ist jedoch auch bei diesen Pflanzenarten erwünscht. Es stellt sich daher die Frage, ob die GMS so zu beeinflussen ist, daß sie züchterisch wie eine CMS zu nutzen ist. Klar definierte GMS-Systeme bilden die Voraussetzung, um diese Fragestellung bearbeiten zu können.

Beim Schnittlauch konnten neben dem CMS-System drei Kerngene (*Wi/wi*, *St1/st1*, *St2/st2*) nachgewiesen werden, die in rezessiver Form männliche Sterilität auslösen können (TATLIOGLU 1994). In der vorliegenden Arbeit soll geklärt werden, ob diese drei Kerngene genische männliche Sterilitäten bedingen, oder ob zusätzlich cytoplasmatische Faktoren an der Ausprägung dieser Sterilitäten beteiligt sind. Dazu sollen Cytoplasmotypen mit variierenden mitochondrialen Genomorganisationen selektiert werden und in einer klassisch genetischen Analyse durch Einlagerung der kerngenetischen Sterilitätsfaktoren in diese verschiedenen Cytoplasmotypen eine Unterscheidung von CMS und GMS herbeigeführt werden. Da das *wi*-Gen in zwei Cytoplasmen ausgeprägt wird, kann bereits davon ausgegangen werden, daß dieses Gen genische männliche Sterilität bedingt (TATLIOGLU 1994; ENGELKE und TATLIOGLU 1996a).

Begründet in der erwähnten Tatsache, daß der Nutzung der GMS in der Hybridzüchtung Grenzen gesetzt sind, wurde der molekularbiologischen Erforschung dieser Sterilitätsform im Vergleich zur CMS bisher wenig Aufmerksamkeit geschenkt. Kenntnisse über die molekularen Grundlagen der GMS könnten aber zu einer besseren Nutzbarkeit dieser Sterilitätsform in der Pflanzenzüchtung beitragen. Im Mittelpunkt der molekularen Untersuchungen, die bei der GMS im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt werden sollen, steht die Fragestellung, ob auch die GMS-Gene mit den Mitochondrien interagieren, indem sie die mitochondriale Genomorganisation verändern oder die Expression mitochondrialer Gene beeinflussen. Hinweise, daß GMS-Gene die Mitochondrien beeinflussen könnten, wurden bei *Nicotiana sylvestris* gefunden. Dort ergab die *in organello* Proteinbiosynthese

männlich steril blühender Regenerate aus Protoplastenkultur ein mitochondriales Proteinstmuster, das sich von den fertilen Ausgangspflanzen unterscheidet und dem zuvor bekannter CMS-Pflanzen gleicht (DE PAEPE et al. 1990). Die männlich steril blühenden Regenerate ließen sich bezüglich ihrer mitochondrialen Genomorganisation jedoch nicht von den Ausgangspflanzen unterscheiden und wurden deshalb der GMS zugeordnet. Allerdings fehlt bei diesen Versuchen ein klarer klassisch genetischer Nachweis der GMS. Andere Arbeiten, in denen die molekularen Grundlagen von CMS und GMS verglichen werden, sind nicht bekannt.

Eine Möglichkeit die pflanzenzüchterische Nutzbarkeit von GMS-Systemen zu verbessern, könnte in ihrer Beeinflussung durch geänderte Umweltbedingungen oder durch die Applikation von Chemikalien erfolgen. Im Rahmen des Vergleichs von CMS- und GMS-Systemen wird in der vorliegenden Arbeit die Wirkung von Temperaturvariationen und Tetracyclinapplikationen auf die Ausprägung der drei neuen Sterilitätsformen beim Schnittlauch untersucht. Dabei wird auch der Blütezeitpunkt als Indikator für Frühzeitigkeit erfaßt und seine züchterische Bedeutung diskutiert.

Die oben dargestellten Fragestellungen zum Verständnis der männlichen Sterilität erfordern es, die Grundlagen und Nutzungsmöglichkeiten der männlichen Sterilität in einem möglichst breitem Kontext zu diskutieren. Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag dazu leisten, indem durch einen Vergleich der am Schnittlauch erlangten Kenntnisse mit anderen Pflanzenarten Gemeinsamkeiten und Unterschiede dieser für die Pflanzenzüchtung so wichtigen Merkmalsausprägung herausgearbeitet werden. Dazu werden neben cytologischen Untersuchungen, klassisch genetischen Analysen und Prüfung von Umwelt- bzw. Behandlungseinflüssen auf die männliche Sterilität zusätzlich weite Bereiche der Mitochondriengenetik betrachtet; im engeren Sinne sind dies die Variabilität des mitochondrialen Genoms, dessen Vererbung und Expression sowie die Beeinflussung dieser Prozesse durch das Kerngenom. Die nachfolgenden Kapitel bauen inhaltlich aufeinander auf, jedes Kapitel ist aber durch eine eigene Einleitung und Diskussion in sich abgeschlossen und verständlich.

2 Grundlagen des Entwicklungsprozesses der Blütenorgane höherer Pflanzen

2.1 Einleitung

Ist bei einer Pflanze die Umstimmung vom vegetativen zum generativen Wachstum erfolgt, so bedarf es einer Abfolge von Prozessen, an deren Ende eine "perfekte" Blüte gebildet wird. Eine solche Blüte besteht aus vier Organtypen, die in den meisten Fällen konzentrisch, in Wirteln, angeordnet sind: Von außen nach innen sind dies die Sepalen (Kelchblätter), Petalen (Blütenblätter), Stamina (Staubblätter) und Karpetalen (Fruchtblätter).

Die Initiation der Blütenmeristementwicklung erfolgt durch Meristemidentitätsgene. Mutationen dieser Gene führen beispielsweise zur Verlaubung. Solche Gene sind *Leafy* und *Ap1* in *Arabidopsis* (WEIGEL et al. 1992; MANDEL et al. 1992) sowie *Floricaula* und *Squamosa* bei *Anthirrhinum* (COEN et al. 1990; HUIJSER et al. 1992). Die Initiation der verschiedenen Organtypen innerhalb des Blütenmeristems wird durch Cadastralgene definiert, da diese die Expressionsbereiche der nachgeschalteten Organidentitätsgene festlegen. Eine Mutation dieser Organidentitätsgene hat immer den Wechsel zweier Organtypen zur Folge, eine Doppelmutante trägt nur noch einen Organtyp. Aus dieser Beobachtung wurde ein Modell entwickelt, daß die beteiligten Gene in drei Funktionsklassen einordnet (COEN und MEYEROWITZ 1991, Abb. 2.1).

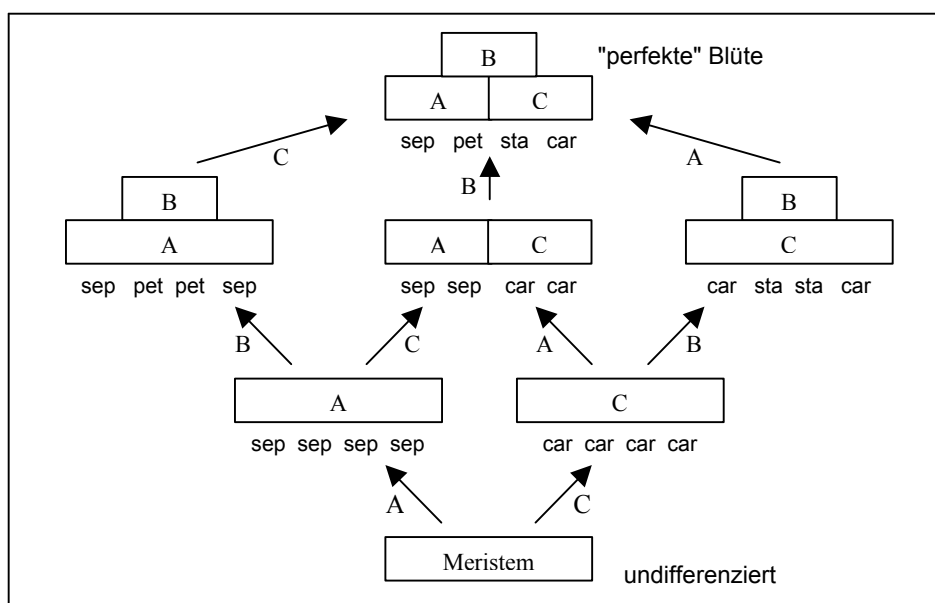


Abb. 2.1: Modell zur Beschreibung der ABC-Funktionen der Organidentitätsgene. sep = Sepalen, car = Karpetalen, pet = Petalen, sta = Stamina, weitere Erläuterungen im Text. (nach Coen und Meyerowitz 1991, verändert).

Nach dem Modell aus Abbildung 2.1 führen die A-Funktionsgene zur Bildung von Sepalen und die C-Funktionsgene zur Bildung von Karpetalen. Werden beide gleichzeitig exprimiert, bestehen die beiden äußeren Wirtel aus Sepalen, die beiden inneren aus Karpetalen. Die A- und C-Funktionsgene haben gleichzeitig eine Cadastralfunktion auf die B-Funktionsgene, die nur im zweiten und dritten Wirtel exprimiert werden. Zusammen mit den A-Funktionsgenen entstehen dort Petalen, in Verbindung mit den C-Funktionsgenen die Stamina. In einer "perfekten" Blüte werden alle drei Funktionsklassen in jeweils zwei Wirteln exprimiert, womit sich die bereits erwähnten Mutationsphänotypen, die immer mindestens zwei Wirtel betreffen, erklären lassen. Gene für alle drei Funktionen konnten als homologe Paare bei *Arabidopsis* und *Antirrhinum* isoliert und später auch in anderen Pflanzenarten nachgewiesen werden (zusammengefaßt in AINSWORTH et al. 1998). Die Organidentitätsgene kodieren für Transkriptionsfaktoren, die als MADS-Box Familie zusammengefaßt werden (benannt nach den ersten vier identifizierten Genen, zusammengefaßt in SHORE und SHARROCKS 1995; THIESSEN und SEIDLER 1995). Die von den MADS-Box Genen kodierten Proteine haben alle einen konservierten Aminosäurebereich am N-Terminus, der sie zur Anlagerung an DNA und zu Interaktionen mit anderen Proteinen befähigt (SCHWARZ-SOMMER et al. 1990, SHORE und SHARROCKS 1995). Eine zweite konservierte Region ist die K-Box, die ebenfalls Protein-Proteininteraktionen ermöglicht (MA et al. 1991).

Diese ersten Gene der Entwicklungsschritte der Blüte sind unerläßlich, und die Tatsache, daß homologe Formen auch in Koniferen nachgewiesen wurden, macht ihren frühen Ursprung in der Evolution deutlich (TANDRE et al. 1995; AINSWORTH et al. 1998).

Am Ende der Kaskade der Gene der Blütenentwicklung stehen die geschlechtsdeterminierenden Gene, deren determinierende Form zum Abbruch der bereits initiierten Organentwicklung führt. In diesem Fall sind in der Regel die betroffenen Organtypen noch rudimentär erkennbar und die übrigen Blütenorgane voll funktionsfähig. Im folgenden wird die Entwicklung der männlichen Sexualorgane beschrieben und dazu Ergebnisse cytologischer Untersuchungen dargestellt, die den Verlauf der Mikrosporogenese und deren Abbruch bei den in der vorliegenden Arbeit behandelten Sterilitätsformen *wi*, *st1* und *st2* beschreiben. Die praktischen Arbeiten dazu wurden im Rahmen einer Diplomarbeit von Frau SUSANNE HÜLSMANN durchgeführt.

2.2 Material und Methoden

2.2.1 Pflanzenmaterial

Als Ausgangsmaterial für die cytologischen Untersuchungen dienten neben fertilen Pflanzen (Abb. 2.2a), männlich sterile Pflanzen des bekannten CMS-Systems (Abb. 2.2b),

die mit männlich sterilen Pflanzen der *wi*- (Abb. 2.2c), der *st1*- (Abb. 2.2d) und der *st2*-Sterilität verglichen wurden.

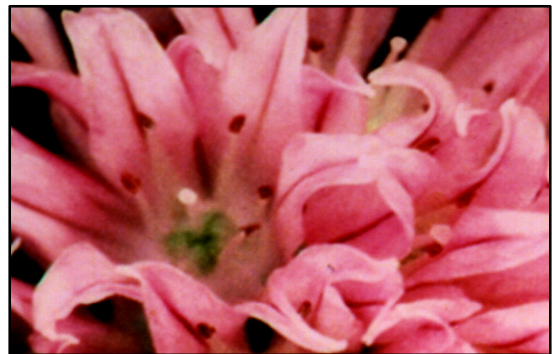


a) fertiler Phänotyp

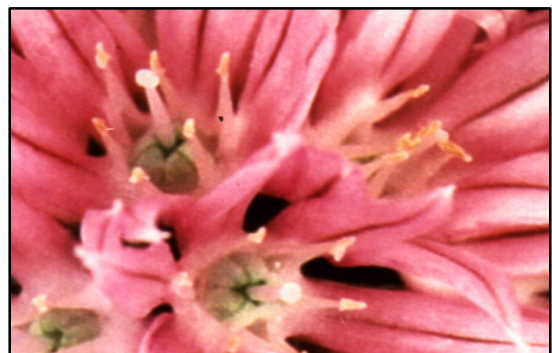


b) Cytoplasmatisch männlich steriler Phänotyp

c) *wi*-Sterilität
Antheren punktförmig, bei älteren Blüten dunkel verfärbt



d) *st1*- Sterilität:
ähnlich der CMS, aber größere Antheren und längere Filamente



e) *st2*-Sterilität
Filamente stark verkürzt, Antheren stark verkleinert, Farbe ähnlich den Blütenblättern



Abb. 2.2: Charakteristische Phänotypen eines fertilen (a) und eines cytoplasmatisch männlich sterilen (b) Genotyps sowie der drei neuen Sterilitätsformen *wi* (c), *st1* (d) und *st2* (e).

2.2.2 Färbetechniken für cytologische Untersuchungen der Mikrosporogenese

Für die cytologischen Untersuchungen wurden Blütendolden mit dem Technovit-System Kulzer fixiert, eingebettet, und anschließend Mikrotomschnitte durchgeführt (beschrieben bei RUGE et al. 1993; HÜLSMANN, pers. Mitteilung). Die Färbung der Schnitte erfolgte mit 0,003% Toluidin-Blau: RNA wird lila, DNA blau-grün, Polyphosphate, -Sulfate und verschiedene Säuren (Bestandteile des Cytoplasmas) rötlich-lila und Phenole und Lignine blau-grün gefärbt (O'BRIAN und MCCULLY 1981). Zur Anfärbung von Kallose wurde eine Fluoreszenzfärbung mit 0,1% Anilin-Blau durchgeführt (HÜLSMANN, pers. Mitteilung).

2.3 Ergebnisse

2.3.1 Der Mikrosporogeneseverlauf bei der *wi*-, *st1*- und *st2*-Sterilität im Vergleich zu fertilen Schnittlauchpflanzen

Zunächst wird die Mikrosporogenese einer fertilen Schnittlauchpflanze dargestellt, um anschließend die Stadien der Entwicklung zu erfassen, die bei den Sterilitätsformen *wi*, *st1* und *st2* zum Abbruch der normalen Funktion führen.

Die Struktur einer Anthere mit ihren zwei Theken, die jeweils zwei Pollensäcke enthalten, ist in der Abb. 2.3 (Antherenansicht im Tetradenstadium) dargestellt. Weiterhin sind dort die Stadien der Mikrosporogenese abgebildet: In den Pollensäcken befinden sich die diploiden Pollenmutterzellen, aus denen durch meiotische Teilungen die Mikrosporen entstehen. Diese sind während der Teilungen von der Kallosewand der Pollenmutterzellen umgeben, so daß die charakteristischen Diaden und Tetraden gebildet werden. Der Pollensack ist mit dem Tapetum, einem Nährgewebe, ausgekleidet, das beim Schnittlauch und der Zwiebel nur einkernig, in vielen anderen Arten aber mehrkernig ist. Das Tapetum scheidet Kallase ab, so daß die Mikrosporen aus dem Tetradenverband entlassen werden, und Sporopollenin, das die Exine der Mikrosporenwand bildet. Das Nährgewebe wird nach dem Tetradenstadium zurückgebildet, teilweise ist es gar nicht mehr erkennbar, teilweise liegt es aber weiterhin strukturiert vor. In den Mikrosporen erfolgt eine mitotische Teilung, die zu einer vegetativen und einer generativen Zelle innerhalb des Pollenkorns führt. Der generative Kern teilt sich zu einem späteren Zeitpunkt noch ein weiteres mal, so daß der Pollen letztlich einen vegetativen und zwei generative Kerne besitzt. Mit der Entlassung der Mikrosporen aus dem Tetradenverband verändert sich auch das sporophytische Gewebe, indem sich die Antheren vergrößern, und die Trennung der beiden Pollensäcke einer Theke aufgehoben wird. Das Mesothecium ist weitgehend abgebaut, während die Zellwände des Endotheciums faserige Verdickungsleisten bilden (vergl. Abb. 2.3: Antherenansicht im Pollenstadium). Sinkt der Turgor im Endothecium, so führen die unelastischen Verdickungsleisten zum Aufreißen der Anthere, so daß der Pollen ausgeschüttet wird.

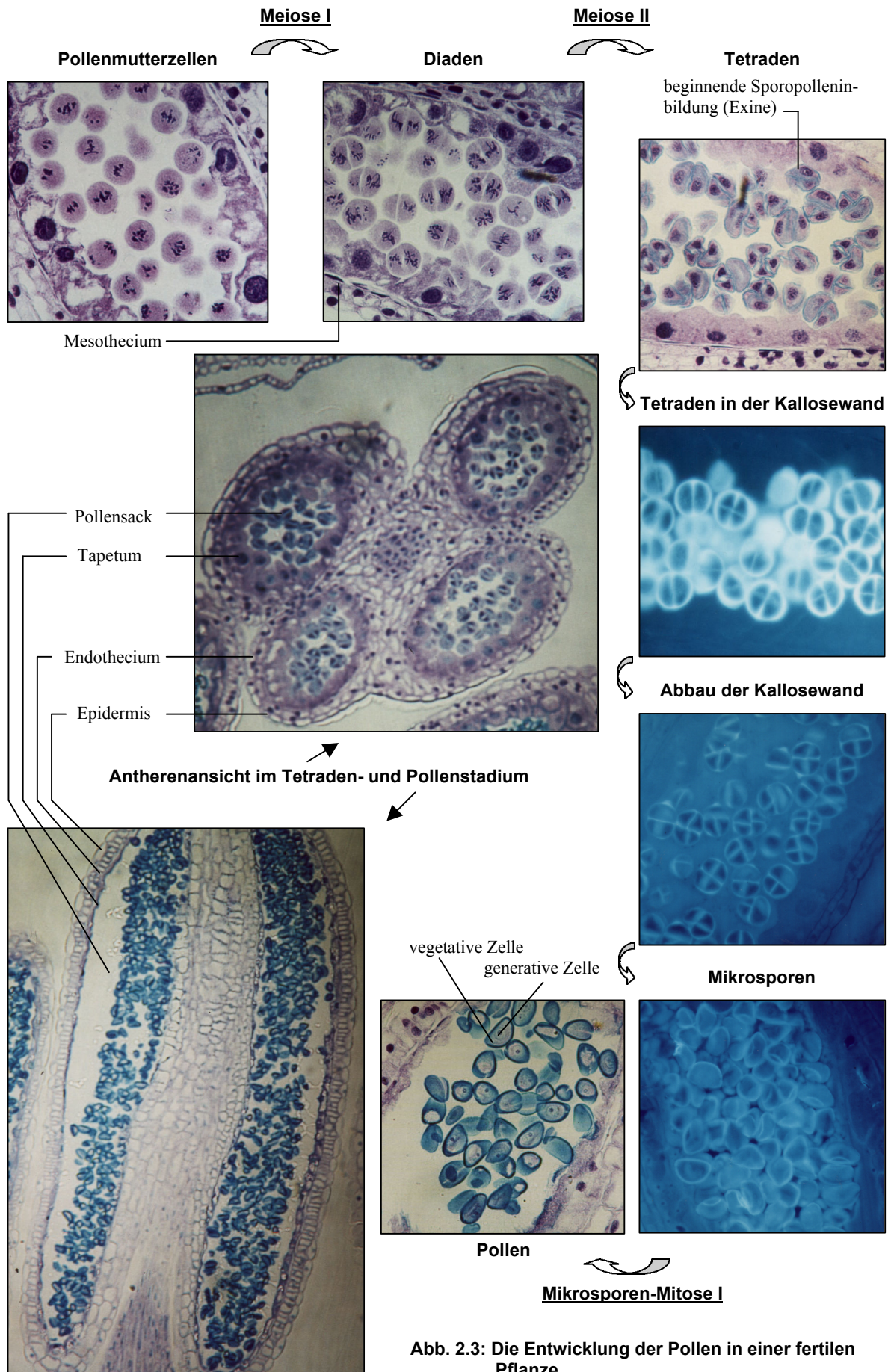


Abb. 2.3: Die Entwicklung der Pollen in einer fertilen Pflanze

In der Abbildung 2.4 sind Mikrosporogenese-Stadien dargestellt, die sich bei der *wi*-Sterilität von denen der fertilen Pflanzen (Abbildung 2.3) unterscheiden.

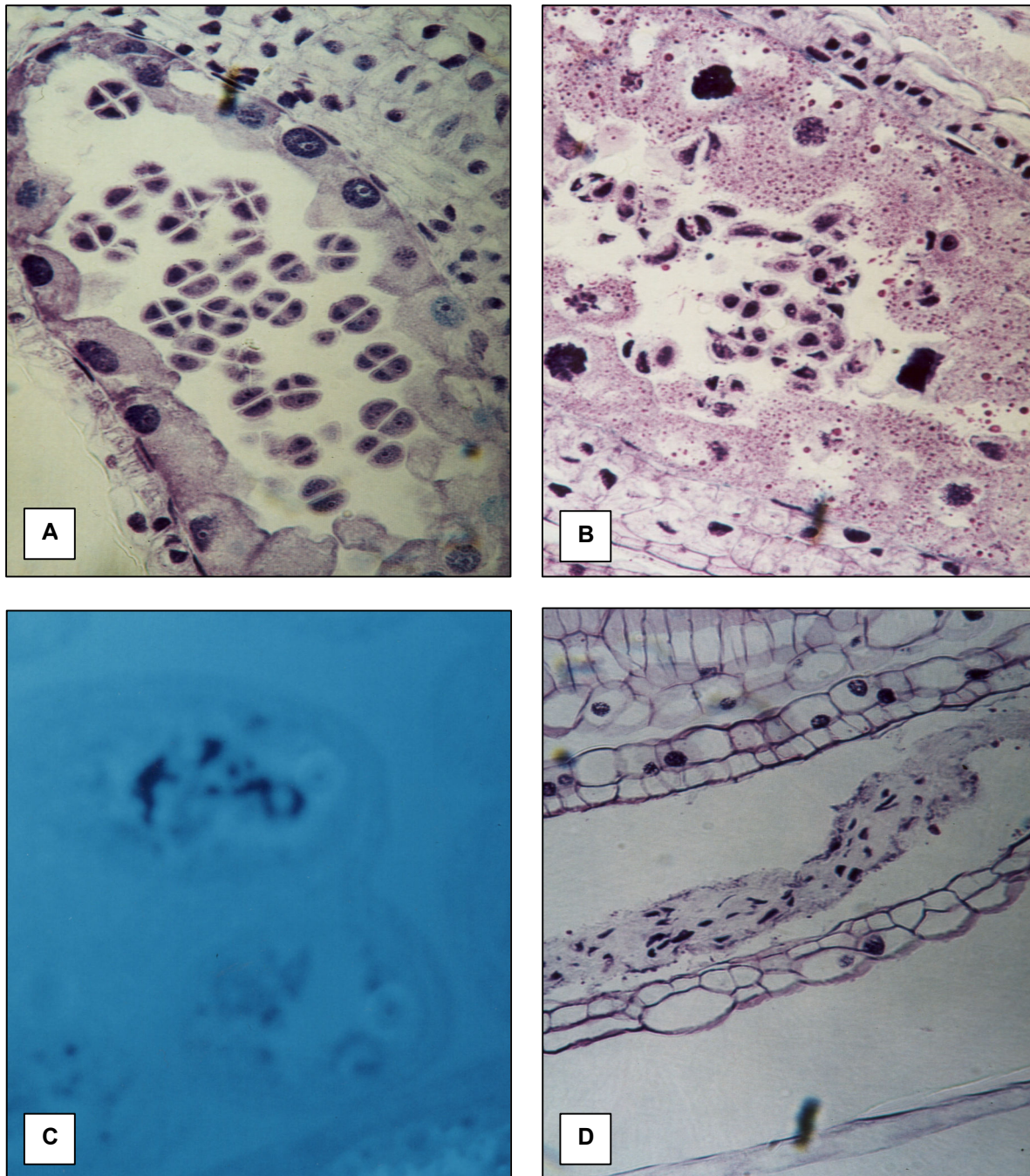


Abb. 2.4: Abbruch der Mikrosporenenentwicklung bei der *wi*-Sterilität.

A: Im Gegensatz zu den fertilen Pflanzen wird im Tetradenstadium kein Sporopollenin für die Exine gebildet.

B: Das Tapetum beginnt sich stark zu vergrößern und bildet ungewöhnliche dunkle Einschlüsse sowie Vakuolen.

C + D: Die Kallose des Tetradenstadiums wird abgebaut, jedoch entwickeln sich die Mikrosporen nicht weiter, das Tapetum löst sich von der Antherenwand und verkümmert.

Die in Abbildung 2.4 dargestellten Ergebnisse zeigen, daß die *wi*-Sterilität auf dem Abbruch der Mikrosporogenese beruht, der direkt im Anschluß an das Tetradenstadium erfolgt.

In der Abbildung 2.5 sind Stadien der Mikrosporogenese dargestellt, die sich bei der *st1*-Sterilität von denen der fertilen Pflanzen (vergl. Abb. 2.3) unterscheiden.

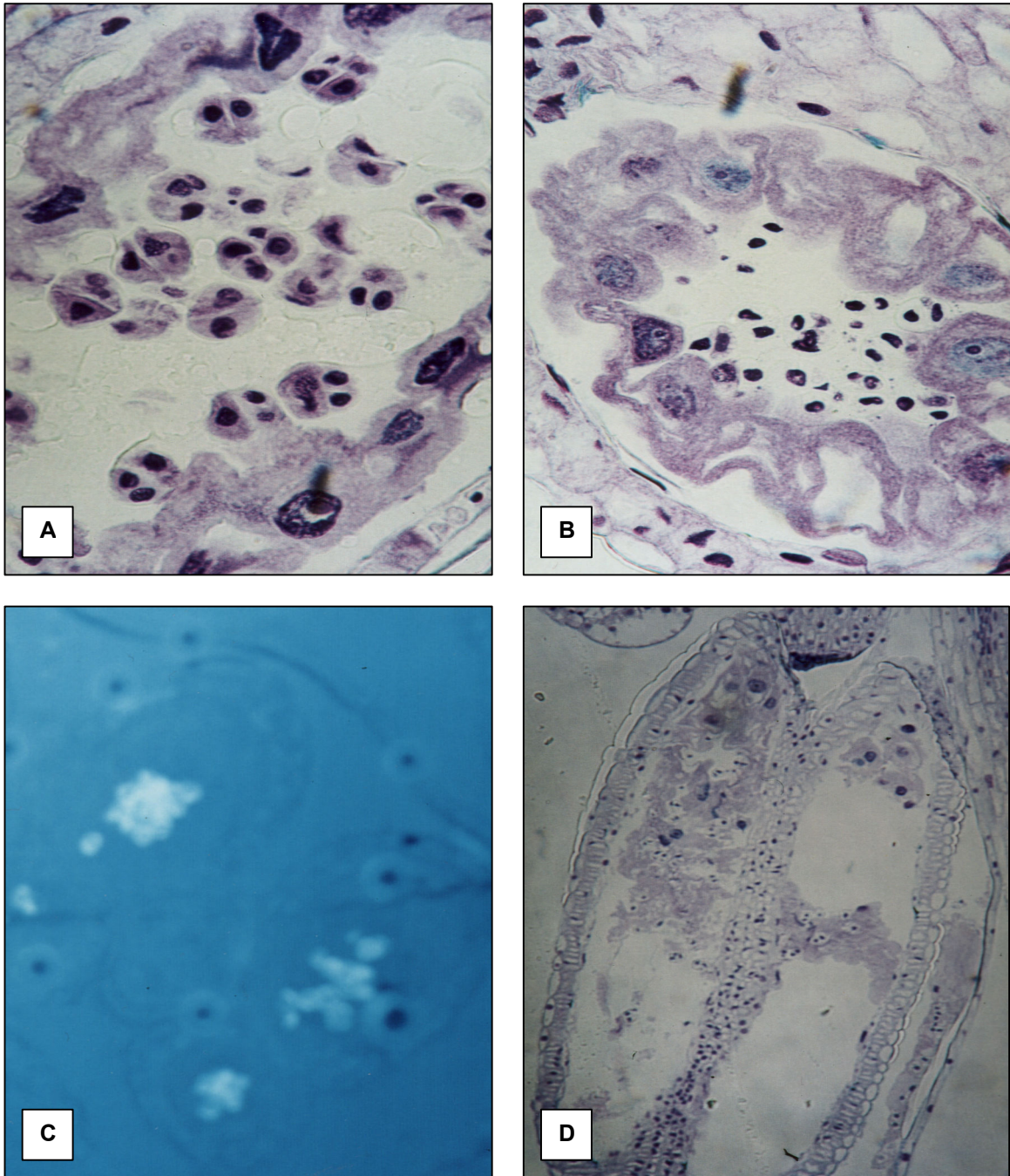


Abb. 2.5: Abbruch der Mikrosporenenentwicklung bei der *st1*-Sterilität.

- A:** Im Gegensatz zu den fertilen Pflanzen wird im Tetradenstadium kein Sporopollenin für die Exine gebildet.
- B:** Das Tapetum beginnt sich durch Vakuolenbildung stark zu vergrößern und von der Antherenwand abzulösen.
- C:** Die Kallosewand wird im Tetradenstadium nicht abgebaut.
- D:** Das Tapetum und die Mikrosporen bleiben im Zentrum der fast leeren Anthere liegen. Die äußeren Zellwandschichten, Epidermis und Endothecium, sind normal entwickelt.

Die in Abbildung 2.5 dargestellten Ergebnisse zeigen, daß bei der *st1*-Sterilität ein Abbruch der Mikrosporogenese im Tetradenstadium erfolgt. Im Gegensatz zur *wi*-Sterilität wird die Kallosewand nach dem Tetradenstadium nicht abgebaut.

In der Abbildung 2.6 sind Antheren im Pollenstadium von einer *st2*-sterilen Pflanze einer fertilen Pflanze der gleichen Nachkommenschaft gegenübergestellt.

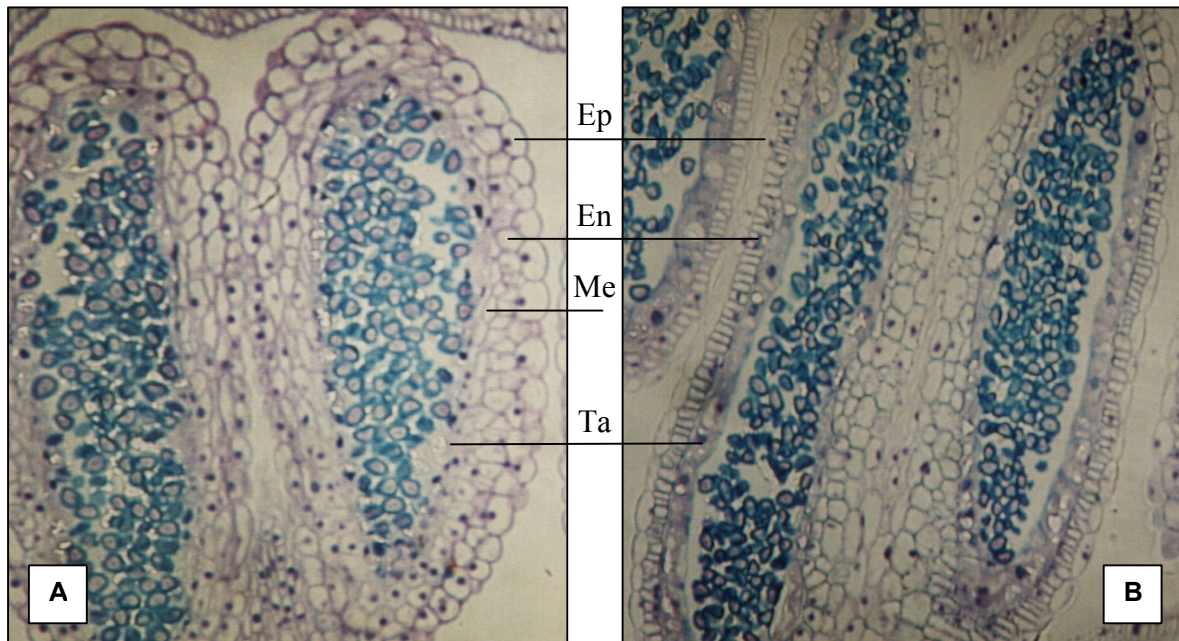


Abb. 2.6: Pollenbildung in den Antheren einer *st2*-sterilen (A) und fertilen Pflanze (B) aus einer spaltenden Nachkommenschaft.

Ep = Epidermis, En = Endothecium, Me = Mesotheceum, Ta = Tapetum.

Bei der *st2*-Sterilität verläuft die Mikrosporogenese im Gegensatz zu den oben beschriebenen Sterilitäten bis zum Pollen wie bei den fertilen Pflanzen. Allerdings ergeben sich Unterschiede betreffend des sporophytischen Gewebes. Besonders deutlich wird dies beim Endothecium, da die Bildung der faserigen Verdickungsleisten der Zellwände bei den sterilen Pflanzen unterbleibt. Zwischen Endothecium und Tapetum ist eine weitere Zellschicht erkennbar. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um das Mesotheceum, das bei den fertilen Pflanzen aus langgestreckten Zellen besteht und bereits im Tetradenstadium degeneriert (vergl. Abb. 2.3). Die charakteristischen Unterschiede zwischen Epidermiszellen und den Zellen des Endotheciums werden nicht ausgebildet, und die Pollen können nicht entlassen werden. Bei der *st2*-Sterilität handelt es sich demnach um einen funktionellen Schaden der Anthere. Die Pollen lassen sich mit Karminessigsäure anfärben, so daß sie höchstwahrscheinlich befruchtungsfähig sind (vergl. Abb. 2.7).

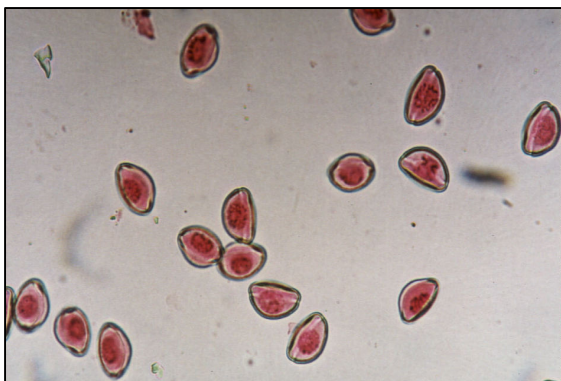


Abb. 2.7: Mit Karminessigsäure gefärbte Pollen einer *st2*-männlich sterilen Pflanze.

2.4 Diskussion

2.4.1 Einordnung der männlichen Sterilitäten in die Entwicklungsstadien der Blütenbildung

Nachdem die Bildung des Blütenmeristem initiiert, und die Organbereiche determiniert sind (vergl. 2.1), durchläuft die Antherenentwicklung zwei Phasen (GOLDBERG et al. 1993). Während der ersten Phase wird die Morphologie der Anthere etabliert, indem die Zellen und Gewebe differenziert werden. Am Ende dieser ersten Phase sind die Differenzierungsprozesse der Gewebe weitgehend abgeschlossen, und die Pollenmutterzellen haben die meiotischen Teilungen durchlaufen, so daß die Tetraden vorliegen. Während sich die Mikrosporen in der zweite Phase weiter differenzieren, beginnt das sporophytische Gewebe nach einer kurzen Phase starken Wachstums mit der Degeneration und Umbildung von Zellen, die letztlich die Freisetzung der Pollen ermöglicht. Diese Phasen müssen mit ihren Differenzierungs-, Umdifferenzierungs- und Dedifferenzierungsprozessen in einer genauen chronologischen Reihenfolge durchlaufen werden, damit am Ende befruchtungsfähige Pollen die Anthere verlassen können.

Störungen in dem beschriebenen Ablauf führen zur männlichen Sterilität. Erfolgen diese Störungen sehr früh in der Entwicklung des Blütenmeristems, so werden gar keine Antheren gebildet, sondern es kommt zu homeotischen Mutationen, bei denen die Antheren durch andere Blütenorgane ersetzt sind. Solche homeotischen Mutationen werden durch die in 2.1 beschriebenen Gene bedingt, können aber auch durch Veränderungen im Cytoplasma hervorgerufen werden. Insbesondere bei *Nicotiana* sind bei intra-generischen Kreuzungen (HICKS et al. 1977) und nach Protoplastenfusionen (KOFER et al. 1992) solche cytoplasmatisch bedingten "homeotic-like mutants" beschrieben worden, bei denen Veränderungen spezifischer mitochondrialer DNA-Fragmente nachgewiesen wurden. Aber auch die petaloide CMS der Möhre (THOMPSON 1961) ist ein Beispiel, bei dem die Mitochondrien eine Störung der Differenzierung zu einem sehr frühen Zeitpunkt in der Entwicklung der Stamina bewirken.

Das andere Extrem sind Sterilitätsformen, bei denen zwar die Gewebe der Antheren differenziert, und die Pollenentwicklung ermöglicht wird, deren Freisetzung aber durch Störungen der oben beschriebenen zweiten Phase der Antherenentwicklung verhindert wird. Eine solche Sterilitätsform stellt die *st2*-Sterilität dar. Wie die folgenden Kapitel der vorliegenden Arbeit zeigen werden, ist an der Ausprägung dieser Sterilitätsform ein cytoplasmatischer Erbfaktor beteiligt (ENGELKE und TATLIOGLU 1998), so daß es sich hier um eine CMS handelt. Dies macht deutlich, daß die Mitochondrien am Ablauf sehr früher, aber auch sehr später Entwicklungsstadien beteiligt sind.

Zwischen diesen Extremen kann der Abbruch der Entwicklung zu jedem beliebigen Zeitpunkt erfolgen, wenn Mutationen der beteiligten Gene den chronologisch festgelegten

Ablauf stören. Häufig erfolgt dies im Anschluß an das Tetradenstadium, also beim Übergang in die zweite Phase der Stamenentwicklung, wie bei der *wi*- und der *st1*-Sterilität. Bei der früher beschriebenen CMS vom Schnittlauch (vergl. Kapitel 1) kommt die Mikrosporangese ebenfalls im Anschluß an das Tetradenstadium zum Stillstand (RUGE et al. 1993). Bei dieser Sterilitätsform wird aber im Gegensatz zur *wi*- und *st1*-Sterilität die Pollenwand ausgebildet, so daß in Quetschpräparaten normal geformte Pollenhüllen zu sehen sind, die sich aber im Gegensatz zu befruchtungsfähigen Pollen nicht mit Karminessigsäure anfärben lassen. Das Tapetum zeigt bei dieser CMS unterschiedliche Formen der Entwicklung von früher Degeneration am Anfang des Tetradenstadiums über ein normales Wachstum, bei dem das Tapetum in der Folge aber nicht wieder reduziert wird, bis hin zu einem hypertrophiertem Wachstum (HÜLSMANN, pers. Mitteilung). Eine solche Variationsbreite der Tapetumentwicklung wurde auch in verschiedenen Herkünften der CMS bei der Zwiebel gefunden; später wurde nachgewiesen, daß diese verschiedenen Formen wie beim Schnittlauch auch innerhalb einer Inzuchtlinie auftreten können (zusammengefaßt in HOLFORD et al. 1991a).

2.4.2 Die Bedeutung von CMS und GMS für die Evolution

Durch Mutationen zur männlichen Sterilität und damit zur Schaffung weiblicher Individuen wird die Allogamie (Fremdbefruchtung) in einer hermaphroditischen Population gefördert und mit ihr die Heterozygotie, die genetische Variabilität und der genetische Austausch. Dies kann in natürlichen Populationen einen Selektionsvorteil bewirken, da Inzuchtdepression vermieden wird, und die Anpassungsfähigkeit und damit das langfristige Überleben der Art gesichert wird. Dieser Selektionsvorteil entsteht jedoch nur, wenn bei den hermaphroditischen Pflanzen hochgradig Selbstbestäubung stattfindet. Zur Erhaltung einer solchen gynodiözischen Population (bestehend aus weiblichen und hermaphroditischen Pflanzen) muß die Sexfunktion der weiblichen Pflanzen erhöht sein, indem die durch den Verlust der männlichen Organe freigewordenen Ressourcen genutzt werden (CHARLESWORTH und CHARLESWORTH 1978a).

Eine Mutation zur weiblichen Sterilität wird sich in einer sonst hermaphroditischen Population hingegen kaum erhalten, da die Verbreitung der Mutation über den Pollen durch die Selbstbestäubung der Hermaphroditen behindert wird. Ebenso wird sich eine Mutation zur vollständigen männlichen Sterilität eher behaupten, als eine partielle männliche Sterilität (CHARLESWORTH und CHARLESWORTH 1978b).

Sind hingegen weibliche Pflanzen in der Population vorhanden, haben Mutationen, die die Weiblichkeit der Hermaphroditen reduzieren und gleichzeitig die Männlichkeit fördern einen Selektionsvorteil. Dies gilt in diesem Stadium der Evolution auch für multiple Loci mit kleinen Effekten, so daß keine vollständige weibliche Sterilität in einem Schritt erreicht werden muß (CHARLESWORTH und CHARLESWORTH 1987). Individuen, in denen

beide Geschlechter von Mutationen betroffen sind, haben einen Fitness-Verlust. Aus diesem Grund haben weibliche Sterilitätsmutationen, die in enger Repulsionskopplung zu dem Locus der männlichen Sterilitätsmutation auftreten, einen Vorteil. Aus dem gleichen Grund erfolgt eine Selektion auf Gene oder Chromosomen-Umlagerungen, die crossing over zwischen den Loci verhindern (WESTERGAARD 1958; CHARLESWORTH 1991). Auf diese Weise entstehen Proto-Geschlechtschromosomen. Da die initialen männlichen Sterilitäten meist rezessiv vererbt werden, läßt sich durch den Vorteil der komplementären Dominanz erklären, warum in der Regel XY-Typen männlich sind, also männliche Heterogamete häufiger vorkommt als weibliche (PARKER 1990).

In der Folge werden Mutationen, die einen Vorteil für den heterogametischen und starken Nachteil für den homogametischen Sextyp darstellen, auf dem Proto-Y-Chromosom angereichert. Folglich weitet sich die Region mit reduziertem genetischen Austausch aus (BULL 1983 in DELLAPORTA und CALDERON-URREA 1993). Erfolgt eine erhöhte Transkription vom X-Chromosom bei Herabsetzung der Transkription des Y-Chromosoms wird letzteres degenerieren, da Mutationen, die nicht die männliche Fertilität betreffen, durch die Kompensation des X-Chromosoms keinem Selektionsdruck unterliegen.

Erfolgt eine Kompensation von Mutationen, die die männliche Fertilität betreffen, durch Autosomen, so wird die Geschlechtsausprägung nicht mehr von dem Y-Chromosom sondern von Dosiseffekten, also von dem Verhältnis des X-Chromosoms zu den Autosomen, bestimmt (PARKER und CLARK 1991).

Ein Beispiel, an dem sich die Entwicklungsschritte zur Diözie nachvollziehen lassen ist der Spargel (*Asparagus officinalis*), bei dem die Sex-Chromosomen noch homomorph sind und erst durch eine Trisomenanalyse von LÖPTIEN (1979) unterschieden werden konnten. In diesem System ist die Degeneration des Y-Chromosoms also noch nicht weit fortgeschritten. Dies mag die Lebensfähigkeit von YY-Männchen erklären. Bei den weiblichen Blüten des Spargels bricht die Entwicklung der Stamina ab, sie kollabieren. Dies kann ein Hinweis darauf sein, daß am Anfang der Entwicklung zur Diözie eine Mutation zur vollständigen männlichen Sterilität gestanden hat, wie es oben gefordert wurde. CAPORALI et al. (1994) diskutieren, daß ein starker Anstieg der Rnase-Aktivität in den Antheren die Degeneration bedingt. In den männlichen Blüten werden hingegen Ovarien gefunden, die nicht degenerieren, und deren Entwicklung in unterschiedlichen Entwicklungsstadien zum Stillstand kommt (LAZARTE und PALSER 1979; GALLI et al. 1993; CAPORALI et al. 1994; MACHON et al. 1995). Selten treten sogar noch andromonözische Pflanzen auf, bei denen sich die Ovarien bei einigen Blüten voll entwickeln. Die weibliche Sterilität ist also nicht vollständig, und es spalten noch modifizierende Gene (FRANKEN 1970; MARKS 1973). Bei den hermaphroditischen Blüten findet Selbstbestäubung statt, die Nachkommen zeigen aber starke Inzuchtdepression (GALLI et al. 1993; MACHON et al. 1995). Auch diese Voraussetzungen des oben dargestellten Modells sind also beim Spargel zu beobachten.

Im Gegensatz zur GMS führt CMS nicht zur Diözie, sondern zu einer stabilen Gynodiözie, da es keine Kopplung zwischen dem cytoplasmatischen Erbfaktor der CMS und weiblicher kernbedingter Sterilität geben kann. Die CMS-Pflanzen benötigen zur Erhaltung der Sterilität Maintainer, die selbst nicht weiblich steril werden können, da sonst in der Population keine Befruchtung mehr möglich wäre (ROSS 1978).

3 Variabilität der mitochondrialen Genomorganisation als Voraussetzung für die Entstehung von Normal- und Sterilitäts-Cytoplasmen

3.1 Einleitung

Das mitochondriale Genom der höheren Pflanzen überschreitet mit 200kb in *Brassica hirta* (LEBACQ und VEDEL 1981) bis über 2400kb in der Familie der Cucurbitaceae (WARD et al. 1981) die Größe der mitochondrialen Genome der Tiere und der Pilze erheblich. Bei *Arabidopsis thaliana* wurde das mitochondriale Genom vollständig sequenziert. Es umfaßt etwa 367kb und 57 identifizierte Gene, die nur 10% der Genomgröße erklären. Werden weiterhin Introns, duplizierte Sequenzabschnitte sowie importierte DNA aus dem Kern- oder Chloroplastengenom berücksichtigt, so verbleiben noch immer etwa 60%, die scheinbar funktionslos sind (UNSELD et al. 1997). Theorien, die die Genomgrößenvariation im Verhältnis zu den konservativen kodierenden Bereichen des mitochondrialen Genoms erklären können, sind die für das Kerngenom aufgestellte "skeletal DNA"-Hypothese und die "selfish DNA"-Hypothese. Nach der "selfish"-Hypothese wird der unspezifischen DNA keine Funktion zugeordnet. Sie entsteht durch Kopien, die sich im Genom verteilen können, wenn keine negativen phänotypischen Effekte auftreten und somit kein Selektionsdruck gegen diese DNA besteht (ORGEL et al. 1980). Die "skeletal DNA"-Hypothese geht dagegen davon aus, daß quantitative nichtgenische Funktionen der DNA vorliegen, die die Genomorganisation beeinflussen (BERNARDI und BERNARDI 1986). Ein höherer DNA-Gehalt könnte beispielsweise die Stabilität des Chromatins bei der Faltung fördern (ZUCKERKANDEL, pers. Mitteilung in ORGEL et al. 1980) oder durch die Vergrößerung der Kernmembranoberfläche den Transport der mRNA aus dem Kern begünstigen (CAVALIER-SMITH 1980). Für solche quantitative Effekte im mitochondrialen Genom spricht die bei *Saccharomyces* nachgewiesene Tatsache, daß intergenische Sequenzen für die Weitergabe der Mitochondrien an die Nachkommen von Bedeutung sind (PISKUR 1989).

In der Tabelle 3.1 ist ein Vergleich der kodierenden Information des mitochondrialen Genoms von *A. thaliana* mit dem Lebermoos (*Marchantia polymorpha*), der Grünalge *Prototheca wickerhamii*, der Rotalge *Chodrus chrispus*, dem Pilz *Podospera anserina*, dem Menschen (*Homo sapiens*), der einzelligen Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* und dem Malariaerreger *Plasmodium falsiparum* aufgeführt.

Tabelle 3.1: Vergleich der kodierenden Information von *Arabidopsis thaliana* und anderen Spezies

	<i>A.t.</i>	<i>M.p.</i>	<i>P.w.</i>	<i>C.c.</i>	<i>P.a.</i>	<i>H.s.</i>	<i>C.r.</i>	<i>P.f.</i>
Komplex I								
<i>nad1</i>	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>nad2</i>	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>nad3</i>	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>nad4</i>	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>nad4L</i>	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>nad5</i>	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>nad6</i>	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>nad7</i>	+	Pg	+	-	-	-	-	-
<i>nad9</i>	+	+	+	-	-	-	-	-
Komplex II								
<i>sdhB</i>	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>sdhC</i>	-	+	-	+	-	-	-	-
<i>sdhD</i>	-	+	-	+	-	-	-	-
Komplex III								
<i>cob</i>	+	+ ^a	+	+	+	+	+	+
Komplex IV								
<i>coxI</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>coxII</i>	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>coxIII</i>	+	+	+	+	+	+	-	+
Komplex V								
<i>atp1 = atpA</i>	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>atp6</i>	+ ^b	+	+	+	+	+	-	-
<i>atp8</i>	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>atp9</i>	+	+	+	+	+	-	-	-
Cytochrom-C-Biogenese ^c								
<i>ccb206</i>	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>ccb256</i>	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>ccb452</i>	+	+ ^d	-	-	-	-	-	-
<i>ccb382</i>	+	+ ^e	-	-	-	-	-	-
<i>ccb203</i>	+	+ ^e	-	-	-	-	-	-
Ribosomale Proteine								
<i>rpl2</i>	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>rpl5</i>	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>rpl6</i>	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>rpl16</i>	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>rps1</i>	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>rps2</i>	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>rps3</i>	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>rps4</i>	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>rps7</i>	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>rps8</i>	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>rps10</i>	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>rps11</i>	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>rps12</i>	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>rps13</i>	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>rps14</i>	Pg	+	+	-	-	-	-	-
<i>rps19</i>	Pg	+	+	-	-	-	-	-

Fortsetzung von

Tabelle 3.1: Vergleich der kodierenden Information von *Arabidopsis thaliana* und anderen Spezies

	<i>A.t.</i>	<i>M.p.</i>	<i>P.w.</i>	<i>C.c.</i>	<i>P.a.</i>	<i>H.s.</i>	<i>C.r.</i>	<i>P.f.</i>
Ribosomale RNAs								
<i>rrn5</i>	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>rrn18</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>rrn26</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
Transfer RNAs	22	29	26	23	27	22	3	-
Intronic <i>orfs</i> ^f	0/1	2/8	2/0	-	6/0	-	1	-
Andere <i>orfs</i>								
<i>orfX</i>	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>orfB</i>	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>orf25</i>	+	+	+	+	-	-	-	-

A.t. = *Arabidopsis thaliana*; *M.p.* = *Marchantia polymorpha*; *P.w.* = *Prototheca wickerhamii*; *C.c.* = *Chodrus chrispus*; *P.a.* = *Podospira anserina*; *H.s.* = *Homo sapiens*; *C.r.* = *Chlamydomonas reinhardtii*; *P.f.* = *Plasmodium falciparum*.

+ = intaktes Gen; - = kodierende Region fehlt; Pg = Pseudogen

^a zusätzliches Pseudo-*cob*-Gen; ^b zwei verschiedene Kopien; ^c Nomenklatur ist unklar, deshalb ist die Abkürzung *ccb* (Cytochrom-C-Biogenese) mit der Zahl der kodierten Aminosäuren versehen; ^{d, e} unterteilt in zwei Leserahmen; ^f erste Zahl = Introns der Gruppe I, zweite Zahl = Introns der Gruppe II.

(aus UNSELD et al. 1997).

Wie in Tabelle 3.1 zu sehen ist, unterscheiden sich die aufgeführten Spezies bezüglich der Zahl der Gene, die das mitochondriale Genom enthält. Doch auch innerhalb der Gruppe der höheren Pflanzen kann sich die Anzahl der kodierenden Bereiche der Mitochondrien unterscheiden. Nach der Endosymbiontentheorie ist die Eukaryontenzelle aus einer kernhaltigen Vorläuferzelle hervorgegangen, die prokaryontische Organismen aufgenommen hat, welche sich im Laufe der Evolution zu den Organellen entwickelten (SCHWARTZ und DAYHOFF 1978; LANG et al. 1997). Dabei wurden Genfunktionen an den Zellkern abgetreten, und die genetische Autonomie der Organellen ging schrittweise verloren. Oftmals werden deshalb in den Organellen nur noch Teilsequenzen der Gene gefunden (SCHUSTER und BRENNICKE 1987). So ist der überwiegende Teil der am Aufbau der Mitochondrien beteiligten Polypeptide kernkodiert. Dieser Prozeß ist bei den verschiedenen Arten ungleich weit fortgeschritten. Die Übertragung von Genfunktionen wird besonders bei der *coxII*-Untereinheit (Cytochromoxidase) der Leguminosen deutlich (NUGENT und PALMER 1991; COVELLO und GRAY 1992). Bei der Erbse liegt das Gen im mitochondrialen und im Kerngenom vor, wird aber nur in den Mitochondrien exprimiert. In der Sojabohne und der Gartenbohne befinden sich ebenfalls Kopien des Gens in beiden Genomen, aber nur das nukleare Gen wird exprimiert. In der Mung- und der Pferdebohne ist das Gen in seiner funktionellen Form nur noch im Kerngenom vorhanden.

Der Gentransfer zwischen den Kompartimenten kann aber auch in anderer Richtung erfolgen. Sequenzen nuklearer Herkunft wurden unter anderem im mitochondrialen Genom von *Oenothera berteriana* nachgewiesen (SCHUSTER und BRENNICKE 1987). Sequenzen plastidärer Herkunft wurden ebenfalls im mitochondrialen Genom gefunden (STERN und PALMER 1984, SCHUSTER und BRENNICKE 1987, 1988), vor allem sind dies Gene, die für tRNAs kodieren (sogenannte "plastid-like tRNAs", JOYCE und GRAY 1989).

Die mitochondrialen Gene der Pflanzen sind nicht in einem einheitlichen DNA-Molekül organisiert. Das mitochondriale Genom kann in mehreren zirkulären oder linearen Molekülen unterschiedlicher Größe vorliegen (erstmalig durch Restriktionskartierungen bei *Brassica campestris* gezeigt, PALMER und SHIELDS 1984). In verschiedenen Pflanzenarten konnten unter Verwendung der Pulsfeld-Gelelektrophorese kleinere, native DNA-Moleküle nachgewiesen werden, als nach dem Mastercirkel der jeweiligen Pflanze zu erwarten wäre (BENDICH und SMITH 1990). Diese kleineren Moleküle werden als Subcirkel bezeichnet und entstehen durch Rekombinationsereignisse zwischen sich wiederholenden Sequenzen.

Die Entstehung von kurzen sich wiederholenden Sequenzen ("short repeats", weniger als 200bp) wurde von ANDRÉ et al. (1992) mit reverser Transkription von mRNA und anschließender Insertion erklärt. Eine Rekombination zwischen "short repeats" kann zu neuen Konfigurationen führen. LEVY et al. (1991) fanden in der Maisvarietät 'Black Mexican Sweet' (BMS) ein zirkuläres 120kb Molekül, dessen Entstehung auf eine derartige Rekombination zwischen "short direct repeats" zurückgeführt wird. Da eine Rekombination zwischen kurzen homologen Sequenzbereichen aber ein seltenes Ereignis ist, setzt der dauerhafte Nachweis des 120kb Moleküls dessen autonome Replikation voraus. Solche autonom replizierenden Moleküle werden von den Autoren als "Chromosomen" bezeichnet und sind auch bei anderen Pflanzenarten nachgewiesen worden, z. B. bei der Petunie (FOLKERTS und HANSON 1991) und dem Reis (YAMATO et al. 1992; NARAYANAN et al. 1993). "Long repeats" (über 200bp) sind bei dem 120kb Molekül vom 'BMS'-Mais nicht vorhanden. Durch Rekombination von "short repeats" können aber solche "long repeats" gebildet werden. So fanden SMALL et al. (1989) beim Vergleich des (N)- und (Ru)-Plasmas beim Mais eine 12kb Verdoppelung. Die Autoren haben daraus ein Drei-Schritt Modell abgeleitet, bei dem durch Rekombination von "short repeats" lange sich wiederholende Sequenzen ("long repeats") entstehen können (Abb. 3.1).

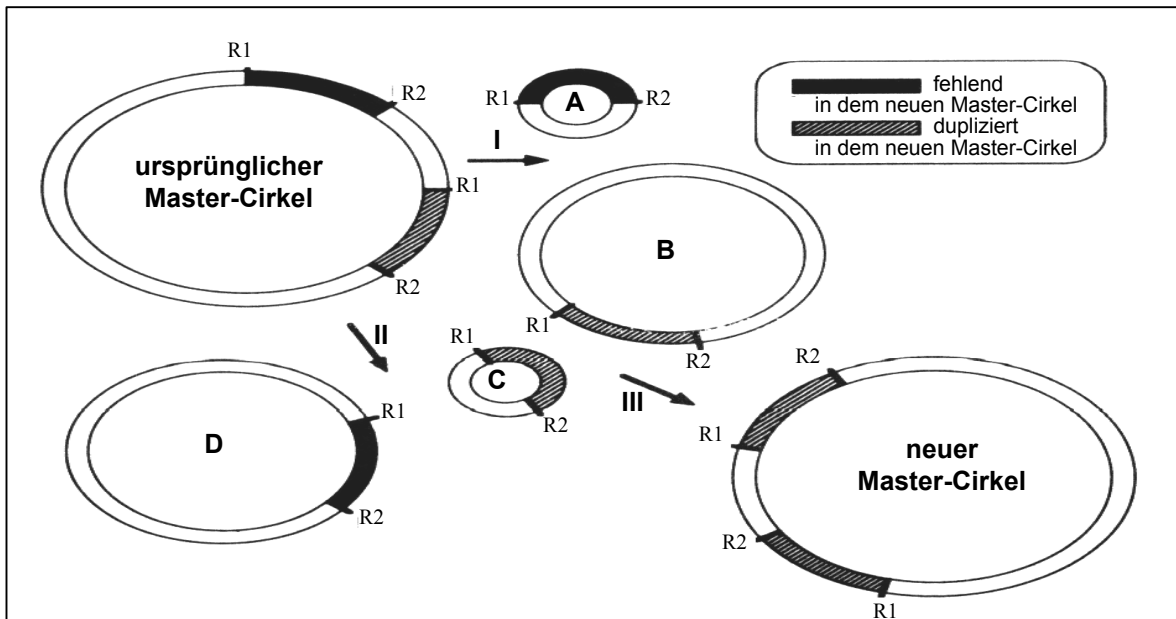


Abb. 3.1: Drei-Schritt Modell für die Entstehung von "long direct repeats" im mitochondrialen Genom. I. Durch eine seltene Rekombination zwischen kurzen "direct repeats" (R1) im ursprünglichen "Master-Cirkelelement" entsteht ein Paar von subgenomischen Cirkelelementen (A und B). II. Eine weitere Rekombination zwischen zwei anderen kurzen "direct repeats" (R2) führt zu einem zusätzlichen Paar subgenomischer Cirkelelemente (C und D). III. Zwei "Subcirkelelemente" (B und C) können nun durch die homologen Bereiche (gestreift) rekombinieren und einen neuen "Master-Cirkelelement" bilden. Dieser beinhaltet eine Duplikation (gestreift), und ihm fehlt ein Bereich gegenüber dem ursprünglichen "Master-Cirkelelement" (schwarz). Dasselbe Ereignis kann in einem Schritt durch ein doppeltes "crossover" zwischen zwei Kopien des Ausgangscirkelelements entstehen. Dies ist aber ein sehr seltenes Ereignis. (aus SMALL et al. 1989)

"Long repeats" können analog zu den "short repeats" auch durch den Einbau von cDNA nach reverser Transkription entstehen (ANDRÉ et al. 1992).

Die Rekombination von "long repeats" war schon 1984 von LONSDALE in einem Modell beschrieben worden. Nach dem Orientierungssinn werden dabei "direct" und "inverted repeats" unterschieden. Ein Rekombinationsereignis zwischen "inverted repeats" führt zu einem "flip-flop", einer Sequenzinversion. Rekombination zwischen "direct repeats" hat ein "loop-out" zur Folge, bei dem zwei kleinere Produkte entstehen.

PALMER und SHIELDS (1984) stellten bei *Brassica campestris* erstmalig die vollständige Restriktionskarte des mitochondrialen Genoms einer höheren Pflanze vor. Dort existieren neben dem 218kb Mastercirkelelement mit der vollständigen Sequenz des mitochondrialen Genoms noch zwei subgenomische Cirkelelemente mit 135 und 83kb. Sie entstehen durch ein "loop-out", an dem ein 2kb langes "direct repeat" beteiligt ist. Im mitochondrialen Genom von *Brassica hirta* sind keine "long repeats" vorhanden. Ein Rekombinationsereignis ist somit nicht zu erwarten. Tatsächlich wurde *in vivo* nur das "Master-Chromosom" und keine Subgenome gefunden (PALMER und HERBORN 1987).

Bei einigen Pflanzenarten konnte ein kausaler Zusammenhang von Rekombinationsereignissen im mitochondrialen Genom und der CMS festgestellt werden. Zuerst gelang

dies beim Mais und der Petunie. Im T- (Texas) Cytoplasma von Mais ist das T-*urf* Gen mit der CMS assoziiert. Dies ist ein chimäres Gen, das sich aus Sequenzen des *rrn26*-Gens, des *atp6*-Gens und des Gens für die Chloroplasten-tRNA von Arginin zusammensetzt (DEWEY et al. 1986). Auch in der Petunie bedingt ein chimäres Gen die CMS. In dieser als *pcf*-Gen ("*Petunia* CMS associated fusion", YOUNG und HANSON 1987) bezeichneten Sequenz ist eine Teilsequenz des *atp9*-Gens mit Abschnitten des *coxII*-Gens und einem undefinierten offenen Leserahmen (*urf*-S) verschmolzen. PRUITT und HANSON (1989) haben aus Sequenzvergleichen mit dem *coxII*-Gen folgendes Modell zur Entstehung des *pcf*-Gens abgeleitet: Ein Transkript des *coxII*-1-Gens wurde nach dem "splicing" revers transkribiert und die entstandene cDNA durch Rekombination in das mitochondriale Genom integriert. Während dieses Prozesses sind Deletionen und "repeats" im Vergleich zum Exon 2 des *coxII*-Gens durch verschobene Basenfehlpaarungen entstanden.

Obwohl die CMS-Sequenzen im T-Cytoplasma vom Mais und in der Petunie beide chimären Ursprungs sind, zeigen sie keine Sequenzhomologie (NIVISION und HANSON 1989). Dies war ein erster Hinweis, daß die mit der CMS assoziierten Sequenzänderungen in verschiedenen Pflanzenarten nicht identisch sind. Auch die Sequenzen bei verschiedenen Sterilitätscytoplasmen innerhalb einer Pflanzenart können sich unterscheiden. So wird beispielsweise beim C- (Charrua) Cytoplasma vom Mais die *atp6*-C Sequenz (zusammengesetzt aus Teilsequenzen des *atp9*- und *atp6*-Gens sowie einem offenen Leserahmen unbekanntes Ursprungs) als Ursache für die CMS diskutiert (DEWEY et al. 1991).

Mitochondriale Genome, die ausschließlich aus dem Hauptgenom mit seinen Master- und Subcirkeln bestehen, werden als homogen bezeichnet und von heterogenen Genomen abgegrenzt, bei denen noch zusätzliche kleinere lineare oder cirkuläre DNA-Sequenzen existieren (LONSDALE 1984). Die genetische Bedeutung dieser Plasmide und Episome ist unbekannt. Charakteristisch für die linearen Plasmide sind ihre terminalen "inverted repeats" und ein kovalent gebundenes Polypeptid am 5'-Ende (HEMBLEBEN 1990). Beispielsweise enthält das S- (USDA) Cytoplasma vom Mais im Gegensatz zum T- und C-Cytoplasma zwei lineare doppelsträngige Episome, S1 (6397bp) und S2 (5453bp), die ein identisches terminales "inverted repeat" (208bp) besitzen (PRING et al. 1977; LEVINGS und SEDEROFF 1983; PAILLARD et al. 1985). Dieses "inverted repeat" kommt auch in der hochmolekulargewichtigen mitochondrialen DNA vor und ist Bestandteil einer mit R bezeichneten 2kb-Sequenz. Rekombinationen zwischen den episomalen und dem integrierten "208bp-repeat" führen zu neuen Organisationen des mitochondrialen Genoms (SCHARDL et al. 1984) und können eine Reversion zur Fertilität zur Folge haben (ESCOTE et al. 1985; ESCOTE-CARLSON et al. 1988; SMALL et al. 1988). Die R-Sequenz selbst ist wiederum chimären Ursprungs (näher beschrieben in 3.4.3) und enthält zwei offene Leseraster, von denen einer oder beide die CMS bedingen (ZABALA et al. 1997).

Die Kopienzahl der mitochondrialen DNA-Moleküle kann sehr unterschiedlich sein, und substöchiometrische Moleküle, sogenannte "sublimons" (SMALL et al. 1989), können zum Verständnis der Vererbung der Mitochondrien und für Rekombinationsereignisse von Bedeutung sein. Veränderungen in der Stöchiometrie der einzelnen mitochondrialen DNA-Moleküle werden häufig bei *in vitro*-Kulturen beobachtet, insbesondere bei Kallus- oder Protoplastenkulturen. Beispielsweise wurden bei *Nicotiana sylvestris* nach Protoplastenkultur einer fertilen Ausgangspflanze zwei CMS-Pflanzen regeneriert, bei denen große Deletionen im mitochondrialen Genom stattgefunden hatten (HAKANSSON et al. 1988, LI et al. 1988). CHÉTRIT et al. (1992) haben aus dem Vergleich der Restriktionsfragmente fertiler Pflanzen (T-Linie) mit denen der sterilen Pflanzen ein Modell erarbeitet, bei dem durch zwei Rekombinationsereignisse Subgenome entstehen, von denen Teile während der Regeneration der Pflanze durch geringe Replikationsraten wieder verloren gegangen sind. Zwar unterscheiden sich die Deletionen der sterilen Pflanzen, gemein ist ihnen aber das Fehlen eines 16,2kb langen Sequenzabschnitts (CHÉTRIT et al. 1992). Der fehlende Sequenzabschnitt beinhaltet zwei der vier Exons des *nad7*-Gens (PLA et al. 1995). Die zunächst als vollständig deletiert angesehenen Sequenzabschnitte konnten mittels PCR auch in den sterilen Pflanzen nachgewiesen werden, sie liegen folglich noch als "sublimons" vor (PLA et al. 1995). Ebenso konnten die deletierten mitochondrialen Cirkel mittels PCR auch bei den fertilen Ausgangspflanzen nachgewiesen werden (LELANDAIS et al. 1998). Folglich hat die Protoplastenkulturphase nicht die Rekombination ausgelöst, sondern das stöchiometrische Verhältnis bereits vorliegender DNA-Cirkel verändert. Neben dem NAD7-Polypeptid fehlen bei den männlich sterilen *N. sylvestris*-Pflanzen zwei weitere Untereinheiten des Komplexes I der Atmungskette. Dabei handelt es sich um das NAD9-Polypeptid und die kernkodierte 38kDa Untereinheit (GUTIERRES et al. 1997). Bei *Nicotiana sylvestris* ist also im Gegensatz zu den oben genannten Beispielen die CMS durch einen Genverlust oder den Verlust regulatorischer Sequenzen begründet und nicht durch die Entstehung neuer Sequenzen. Bei diesem Beispiel ist aber auch das vegetative Wachstum der CMS-Pflanzen stark herabgesetzt, so daß sich diese CMS-Form in einer natürlichen Population nicht behaupten könnte (LELANDAIS et al. 1998).

Veränderungen in der Stöchiometrie der mitochondrialen DNA-Cirkel kommen auch in natürlichen Nachkommenschaften vor und sind nicht auf *in vitro*-Kulturen beschränkt. Beispielsweise konnten bei der Petunie in fertilen Pflanzen mittels der PCR Fragmente amplifiziert werden, die mindestens in Teilen mit der CMS-bedingenden Sequenz (*urfS* der *pcf*-Sequenz) identisch sind (SOFERMAN-AVSHALOM et al. 1993). Solche Nachweise können für das Verständnis der Evolution von CMS-Sequenzen bedeutsam sein. Ein weiteres Beispiel ist die CMS von *Phaseolus vulgaris*. Hier ist die CMS-Sequenz (*pvs*, näher beschrieben in Abschnitt 3.4.3) auf einem 210kb-Cirkel lokalisiert, der schon substöchiometrisch bei der Mutterpflanze vorgelegen hat, in deren Nachkommenschaft die CMS-Pflanze ausgelesen wurde (Abb. 3.2). In Nachkommenschaften dieser CMS trat bei

einigen Pflanzen eine Reversion zur Fertilität auf. Bei diesen Revertanten ist der 210kb-Cirkele wieder auf seinen substöchiometrischen Gehalt reduziert (Abb. 3.2; JANSKA et al. 1998). Auf die Bedeutung von Kerngenen, die derartige Veränderungen im mitochondrialen Genom beeinflussen können, wird in Kapitel 6 eingegangen.

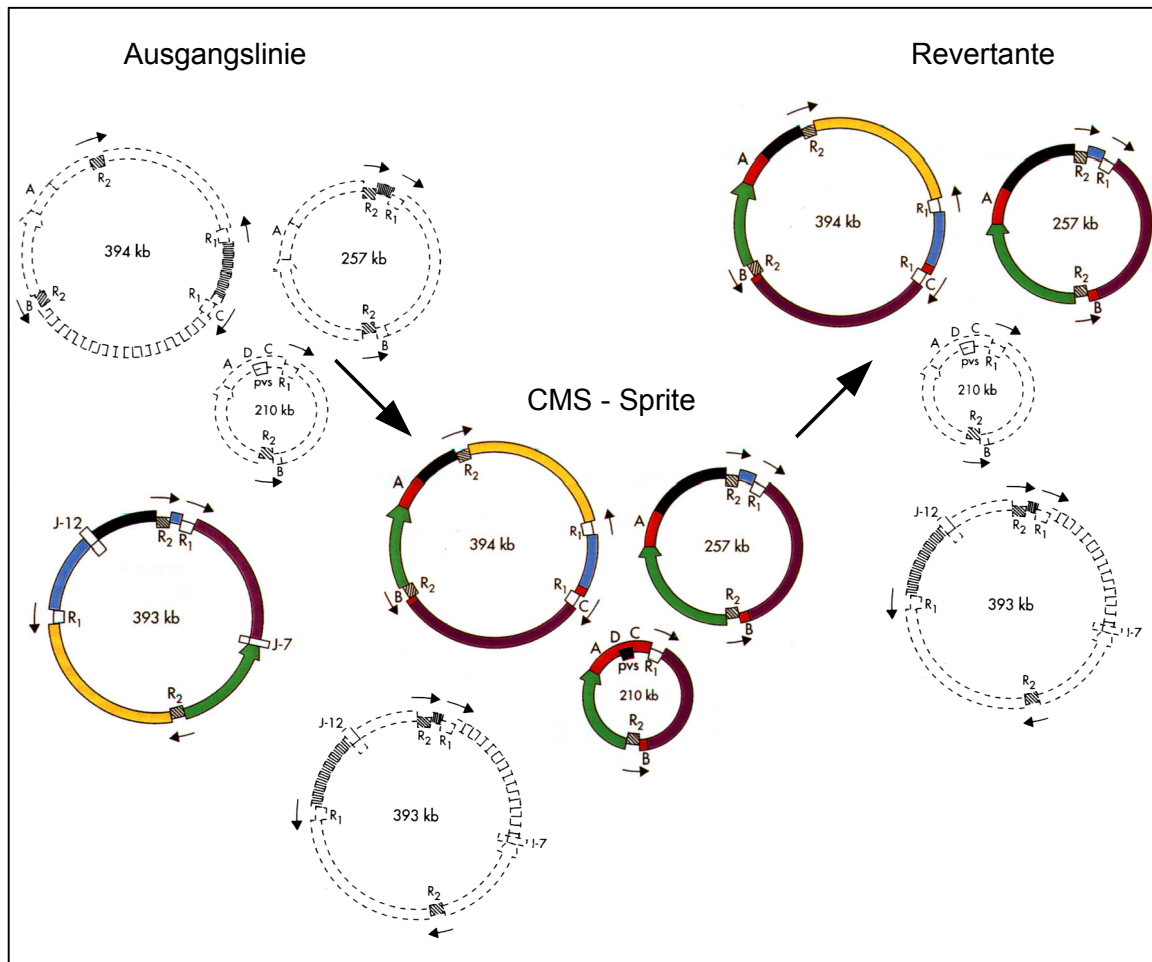


Abb. 3.2: Entstehung von männlicher Sterilität und spontaner Reversion zur Fertilität durch stöchiometrische Veränderungen im mitochondrialen Genom von *Phaseolus vulgaris*.

In der fertilen Ausgangslinie liegt neben dem 393kb-Cirkele substöchiometrisch eine dreiteilige Konfiguration vor (durchbrochene Linien: 394kb, 257kb, 210kb). Dieses stöchiometrische Verhältnis ist bei den CMS-Pflanzen (CMS-Sprite) durch Amplifikation der dreiteiligen Konfiguration und Suppression des 393kb-Cirkels umgekehrt. Die im Vergleich zum 393kb-Cirkele der Ausgangspflanze veränderten Bereiche sind rot unterlegt und durch die Buchstaben A-D unterteilt. Identische Bereiche in den verschiedenen Cirkeln tragen die gleichen Farben. Das 210kb-Molekül enthält mit dem Bereich D einen Sequenzabschnitt, der bei allen übrigen Cirkeln fehlt. In diesem Abschnitt befindet sich die CMS-bedingende *pvs*-Sequenz. Die übrigen Sequenzen dieses Cirkels sind auch auf dem 394kb- oder dem 257kb-Cirkele vorhanden. Bei der Revertante ist der 210kb-Cirkele auf ein substöchiometrisches Niveau reduziert, die Funktion der übrigen Gene wird durch die beiden verbliebenen Cirkel gewährleistet. Weiterhin sind die repeats (R1 und R2) mit ihrem Orientierungssinn angegeben, sowie mit J-7 und J-12 zwei Bereiche, die zwischen verschiedenen Ausgangslinien im 393kb-Cirkele variieren (nach JANSKA et al. 1998, verändert).

Die beschriebenen Beispiele zeigen die Bedeutung, die Rekombinationen im mitochondrialen Genom und Veränderungen in der Stöchiometrie der mitochondrialen DNA-Cirkele für die Entstehung von Sterilitätszytoplasmen haben. Aber auch bei Normalzytoplasmen

treten Rekombinationen auf, so daß sich diese bezüglich der Organisation ihrer mitochondrialen Gene unterscheiden können. Die Differenzierung von Normalcytoplasmatypen kann für die Klärung von Abstammungsfragen sehr wichtig sein. Beispielsweise konnte beim Mais durch den Nachweis und die genaue Analyse eines neuen (N)-Cytoplasmas festgestellt werden, daß dieses Cytoplasma den "Urtyp" repräsentiert. Weiterhin wurde ein Wildgras (Teosinte) gefunden, in dem dieser Cytoplasmatyp ebenfalls vorkommt, und das deshalb als Ursprung für den Kulturmais angesehen werden muß (FAURON und CASPAR 1994).

Zur Selektion von Pflanzen, die sich bezüglich der Organisation ihrer mitochondrialen Gene unterscheiden, haben sich Southern-Hybridisierungen mit mitochondrialen Genen als eine geeignete Methode erwiesen. Beim Schnittlauch wurden entsprechende Untersuchungen bereits von MANNSCHEDEL (1989) und POTZ (1992) durchgeführt. Dabei wurden solche Pflanzen zusammengefaßt, die aufgrund klassisch genetischer Analysen das Sterilitäts- bzw. das Normalcytoplasma tragen. Die erhaltenen Hybridisierungsmuster ließen sich unterscheiden und wurden anschließend mit Hybridisierungsmustern von Pflanzen aus anderen Provenienzen verglichen. Dabei wurden weitere Polymorphismen gefunden und entsprechend neue Cytoplasmatypen benannt. Allerdings traten bei diesen Untersuchungen teilweise Phänomene auf, die nicht zu erklären waren. So wurden beispielsweise zunächst als (N)-typisch beschriebene Fragmente später auch im (S)-Cytoplasma nachgewiesen. Eine Erklärungsmöglichkeit für diese unbefriedigende Situation besteht darin, daß bei den Untersuchungen nicht konsequent Einzelpflanzen eingesetzt wurden. Es ist daher zu vermuten, daß mindestens für die Charakterisierung des (N)-Cytoplasmas Pflanzen mit verschiedenen mitochondrialen Genomorganisationen herangezogen wurden. Dies hat zur Folge, daß in dem mit (N) beschriebenen Cytoplasmatyp Fragmente hybridisiert haben, die auf verschiedene Cytoplasmatypen zurückgehen. Eine Abgrenzung zu den zusätzlich beschriebenen Cytoplasmatypen ist somit nicht mehr eindeutig möglich. Aus den genannten Gründen wird im folgenden eine Southern-Analyse mit mitochondrialen Gensonden von Einzelpflanzen beschrieben, deren Ziel es war, eine genaue Abgrenzung von Pflanzen vorzunehmen, die sich bezüglich ihrer mitochondrialen Genomorganisation unterscheiden, um diese Pflanzen anschließend in klassisch genetischen Analysen einzusetzen.

3.2 Material und Methoden

3.2.1 Pflanzenmaterial

Die Pflanzen wurden im Oktober aus Gewächshaus- und Freilandbeständen zusammengestellt und die Ruhephase durch Absenkung der Temperatur auf 10°/8°C (Tag/Nacht) induziert (nach KRUG und FÖLSTER 1976). Mit Temperaturerhöhung auf 20°/14°C begann im Februar die neue Vegetationsperiode. Die ersten geöffneten Blüten konnten im April

geerntet werden. Sie wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Im Juli wurden zusätzlich Blätter von einigen Freilandpflanzen geerntet.

Bezüglich der *wi*-Sterilität standen spaltende Nachkommenschaften zur Verfügung, die aufgrund von Kreuzungen mit Mutterpflanzen verschiedener Herkunft entstanden waren (TATLIOGLU 1994 und pers. Mitteilung). Diese Mutterpflanzen entstammten den Sorten 'Wilau', 'Grolau', 'Gigantic' und dem Basismaterial des Instituts (Pflanze 111). Um zu bestimmen, ob sich die Cytoplasmotypen in diesen Nachkommenschaften unterscheiden, wurden jeweils zwei sterile und zwei fertile Pflanzen untersucht. Bezüglich der *st1*- und der *st2*-Sterilität waren vor Beginn der vorliegenden Arbeit spaltende Nachkommenschaften hergestellt worden, die in mütterlicher Linie alle auf die ursprüngliche männlich sterile Pflanze zurückgehen. Eine Variation des vorliegenden Cytoplasmotyps war unter der Voraussetzung einer konstanten maternalen Vererbung des Cytoplasmas also nicht zu erwarten. Es wurden zur Bestimmung des vorliegenden Cytoplasmotyps sterile und fertile Genotypen aus jeweils einer Nachkommenschaft ausgewählt. Neben den genannten spaltenden Nachkommenschaften der drei neuen Sterilitäten wurden auch cytoplasmatisch männlich sterile und restorierte Genotypen sowie fertile Pflanzen des Basismaterials in die Untersuchungen einbezogen. Die untersuchten Pflanzen sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefaßt.

Tabelle 3.1: Pflanzenmaterial für die Untersuchungen zur mitochondrialen Genomdiversität

Cytoplasmatische männl. Sterilität	<i>wi</i> -Sterilität, Pflanzen in mütterlicher Linie zurückgehend auf				<i>st1</i> -Sterilität	<i>st2</i> -Sterilität
	'Wilau'	'Grolau'	'Gigantic'	111		
steril (S) <i>xx</i> : 2010/9 7044/5	steril <i>wiwi</i> : 10009/26 10015/73	11013/103 11013/121	11038/17 11038/68	11061/20 11061/106	steril <i>st1st1</i> : 7003/95	steril <i>st2st2</i> : 10040/16
restoriert (S) <i>X</i> .: 7044/6	fertil <i>Wi</i> .: 10009/3 10015/53	11013/64 11013/78	11038/26 11038/38	11061/19 11061/98	fertil <i>St1</i> .: 7003/3	fertil <i>St2</i> .: 10040/12

fertile Pflanzen des Basismaterials*:

W1115/47, Gr. 7, Gr. 9, 111, 2023/1, 2023/16, 2035/1, 4099/1

* Bei einigen dieser Pflanzen war in früheren Untersuchungen die Konstitution am Restorerlocus *X/x* geklärt worden (TATLIOGLU 1982). Entsprechende Kreuzungsanalysen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit wiederholt bzw. erweitert, die Ergebnisse sind in Kapitel 4 dargestellt.

3.2.2 Isolierung von Gesamt-DNA, Restriktion, Agarose-Gelelektrophorese und Blotting

Isolierung von Gesamt-DNA mit der "Serum separation tube technique":

Diese Methode (BENTZEN et al. 1990, verändert) nutzt die gleichen Extraktionsmethoden wie die von SAGHAI-MAROOF et al. (1984) beschriebene CTAB-Methode. Durch den Einsatz der "Serum separation tubes (SST)", Rörchen mit integriertem Serumentrenner (Fa. Becton-Dickinson), kann aber mit kleineren Volumina gearbeitet werden. Das

Pflanzenmaterial wurde in einer Schwingmühle (Fa. Retsch) gemörsert, alle dabei genutzten Geräte wurden zuvor in flüssigem Stickstoff gekühlt. Das gemörserte Pflanzenmaterial kann bei -80°C gelagert werden.

Zum Aufschluß der Zellen werden zu etwa 150mg gemörsertem Pflanzenmaterial in einem SST 500 μl 2x CTAB und 1ml 1x CTAB gegeben und für 60-90min im Wasserbad bei 65°C inkubiert. Anschließend erfolgt die Phenol-Extraktion mit 1,5ml für 10min und 15min Zentrifugation bei 3000xg (4°C). Der Serumtrenner lagert sich dabei zwischen die Phasen. Der Überstand wird in ein neues SST dekantiert und die Phenol-Extraktion wiederholt. Nach der Zentrifugation wird in das Röhrchen 1,5ml eines Phenol-Chloroform-Isoamylalkoholgemisches (25:24:1) gegeben, erneut 10min geschüttelt und wie oben zentrifugiert. Das Chloroform soll die Denaturierung der Proteine und die Phasentrennung erleichtern, der Isoamylalkohol verhindert das Schäumen und das Ausbilden einer intensiven Interphase (BERTRAM und GASSEN 1991). Anschließend kann eine RNase-Behandlung für 20min bei 37°C mit 0,15 units RNase durchgeführt werden. Es schließt sich eine einmalige Chloroform-Extraktion an (analog der Phenol-Extraktion). Nach erfolgter Zentrifugation wird der Überstand in ein Zentrifugenröhrchen überführt, 1,5ml Isopropanol und 150 μl 3M Na-Acetat zugegeben, und die DNA für mindestens 20min bei -20°C präzipitiert (besser über Nacht). Es folgt eine 15min Zentrifugation bei 9000xg (4°C). Das DNA-Pellet wird mit 1ml 70%igem Ethanol abgelöst, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überspült und erneut für 15min bei 9000xg (4°C) zentrifugiert. Anschließend erfolgt die Trocknung im Vakuum und die Lösung des Pellets in einer entsprechenden Menge (ca. 200 μl) sterilem bi-dest. Wasser oder TE-Puffer.

Der DNA-Gehalt wurde photometrisch über die Extinktion bei 260nm bestimmt. Nach SAMBROOK et al. (1989) entsprechen einer optischen Dichte (OD) von 1 50 μg doppelsträngige DNA pro ml. Danach konnten zwischen 150 und 450 μg pro Probe extrahiert werden. Zur Überprüfung der Verunreinigung der DNA durch Polysaccharide wurde der Quotient aus der OD 260 und der OD 230 gebildet, er schwankte zwischen 1,8 und 2,4. Die Berechnung des Quotienten OD 260/280 für die Verunreinigung durch Polypeptide ergab Werte zwischen 1,8 und 1,9 (bei beiden Quotienten sind Werte $>1,8$ optimal).

Verwendete Chemikalien:

- 1x CTAB:
 - 1% (w/v) CTAB
 - 50mM Tris/HCl
 - 10mM EDTA
 - 0,7M NaCl
 - 1% (w/v) PVP-40.
- 2x CTAB:
Entsprechend 1x CTAB, mit doppelten Konzentrationen der einzelnen Komponenten.
- Phenol, Chloroform, Isoamylalkohol.
- Isopropanol, 3M Na-Acetat und 70%iges (v/v) Ethanol.
- TE-Puffer (Tris-EDTA), pH=8,0:
 - 10mM Tris
 - 1mM EDTA.

Restriktion, Elektrophorese und Übertragung der DNA auf eine Trägermembran

Für einen Restriktionsansatz wurden 15µg DNA und 20 units Restriktionsenzym (Fa. Gibco BRL) eingesetzt. Die enzymatische Reaktion erfolgte in Puffersystemen nach Angabe des Herstellers für mindestens 2h bei 37°C in einem Endvolumen von 30µl. Die Restriktion wurde durch Zugabe von 3µl Bromphenolblau-Ladepuffer gestoppt.

Die Restriktionsfragmente wurden in 0,8%igen Agarosegelen in 1x TAE-Puffer bei 2V/cm Gellänge für 14-16h elektrophoretisch getrennt. Durch Zugabe von Ethidiumbromid zur Gellösung (0,5µl/ml) ist die DNA unter einem Transilluminator (UV-Licht, 302nm) sichtbar. Als Molekulargewichtsmarker diente mit *Hind*III restringierte DNA des Phagen Lambda oder eine 1000bp-Leiter (Fa. Gibco BRL). Die Dokumentation der Gele erfolgte durch Aufnahme mit einer Video-Dokumentationsanlage.

Die Übertragung der DNA auf eine HypobondTM-N⁺ Nylon-Membran (Fa. Amersham) erfolgte mit einem Vakuum-Blotter (Fa. Pharmacia). Dazu wird das Gel für 10min in 0,25M HCl geschwenkt und anschließend in 0,4M NaOH bei 60mbar geblottet. Nach 40min wird die Membran entnommen und für 10min in 2x SSC gewaschen, um Agarose-reste zu entfernen. Eine Fixierung der DNA auf der Membran ist bei diesem alkalischen Blotten nicht notwendig.

Verwendete Chemikalien:

- | | |
|--|--|
| - Restriktionsenzyme und Puffersysteme (Fa. Gibco BRL) | 30% (v/v) Glycerin
0,25% (w/v) Bromphenolblau |
| - Molekulargewichtsmarker: | - Agarose, Ethidiumbromid. |
| 100µg Lambda-DNA | - 1x TAE-Puffer: |
| 75µl steriles bi-dest. H ₂ O | Stammlösung (50x): |
| 50 units <i>Hind</i> III | 2,0M Tris |
| Puffer nach Angabe des Herstellers. | 1,0M Eisessig |
| Restriktion für 2h bei 37°C, | 0,1M EDTA |
| 10min bei 65°C, auf Eis abkühlen. | - 0,25M HCl; 0,4M NaOH. |
| Aliquotierung: 5µl (=1,25µg DNA) + 2µl | - 2x SSC: |
| Bromphenolblau-Ladepuffer. | Stammlösung (20x): |
| Fragmentgrößen (in kb): | 3M NaCl |
| 23,1; 9,4; 6,6; 4,4; 2,0 | 0,3M Na ₃ -Citrat |
| - 1000bp-Leiter (Fa. Gibco BRL) | |
| - Bromphenolblau-Ladepuffer: | |

3.2.3 Beschreibung der heterologen mitochondrialen Gensonden

Die verwendeten heterologen Gensonden wurden aus *Zea mays* (Dr. D. M. LONSDALE, University of Cambridge) oder *Oenothera berteriana* und *Arabidopsis thaliana* (Prof. Dr. A. BRENNICKE, Universität Ulm) gewonnen, und dem Institut für Angewandte Genetik, Hannover zur Verfügung gestellt. Sie sind in Tabelle 3.2 näher beschrieben.

Tabelle 3.2: In Southern-Hybridisierungen verwendete mitochondriale Gensonden

Gen	Größe	Vektor	Ligationsschnittstelle	Herkunft
<i>coxII</i>	2,40 kb	pBR 322	<i>EcoRI</i>	<i>Z. mays</i>
<i>coxIII</i>	1,10 kb	pUC 8	<i>EcoRI</i> - <i>PstI</i>	<i>O. berteriana</i>
<i>nad1</i>	2,20 kb	pBR 322	<i>BamHI</i>	<i>O. berteriana</i>
<i>nad3</i>	1,00 kb	pBluescript	<i>EcoRI</i>	<i>O. berteriana</i>
<i>atpA</i>	1,90 kb	pBR 328	<i>PstI</i> - <i>HindIII</i>	<i>O. berteriana</i>
<i>atp6</i>	1,66 kb	pBluescript	<i>BamHI</i>	<i>A. thaliana</i>
<i>atp9</i>	1,84 kb	pBluescript	<i>BamHI</i>	<i>A. thaliana</i>
<i>cob</i>	0,68 kb	pBR 328	<i>PstI</i> - <i>HindIII</i>	<i>Z. mays</i>
<i>rrn18</i>	1,88 kb	pBluescript	<i>ApaI</i>	<i>A. thaliana</i>
<i>rrn26</i>	4,80 kb	pUC 8	<i>SmaI</i>	<i>Z. mays</i>

3.2.4 Transformation von *Escherichia coli*, Klonierung und Isolierung der Inserts

Transformation der Plasmide in *Escherichia coli*

Für die Transformation der Plasmide wurden kompetente Zellen von *Escherichia coli* (XL-1-Blue MRF) der Firma Stratagene nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Der Transformationsansatz (100µl) wurde auf festem LB-Medium in Petrischalen ausplattiert. Zur Selektion waren dem Medium 20µg/ml Ampicillin zugesetzt. Die Ampicillinresistenz ist vektorkodiert, so daß nur transformierte Bakterien auf dem Selektionsmedium wachsen. Zusätzlich erfolgte eine Weiß/Blau-Selektion. Dazu wurden 40µl einer 2%igen (w/v) X-Gal-Lösung (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactosid) pro Petrischale ausgestrichen und 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Vor dem Ausplattieren des Transformationsansatzes wurden diesem 20µl einer 100mM IPTG-Lösung (Isopropylthiogalactosid) zugesetzt. Der verwendete Stamm von *E. coli* kann aufgrund einer Deletion keine aktive β-Galactosidase synthetisieren. Durch Transformation mit reiner Plasmid-DNA (also ohne Inserts) wird diese Deletion kompensiert (" -Komplementation). Das farblose X-Gal wird von der β-Galactosidase gespalten, wobei ein blau gefärbtes Indigo-Derivat entsteht. Blau gefärbte Kolonien enthalten demnach zwar das Plasmid, nicht aber das mitochondriale Insert. Bei rekombinierten Plasmiden, bei denen eine Insertion der mitochondrialen Fremd-DNA erfolgt ist, kann durch die Insertion das " -Peptid nicht mehr synthetisiert werden, eine Komplementation erfolgt also nicht. Somit bleiben die Kolonien weiß. Nach Inkubation bei 37°C über Nacht wurden Bakterien mit rekombinierten Plasmiden (weiße Kolonien) abgenommen und erneut über Nacht in 3ml flüssigem LB-Medium vermehrt. Zur Erhaltung wurde die Suspension mit 80%igem (v/v) sterilen Glycerin im Verhältnis 1:1 versetzt und bei -80°C gelagert.

Verwendete Chemikalien:

- Kompetente Zellen von *Escherichia coli* (XL-1-Blue MRF, Fa. Stratagene).
- LB-Medium, flüssig (Luria-Bertani):
 - 1% (w/v) Casein (enzymatisch hydrolysiert)
- 0,5% (w/v) Hefeextrakt
- 0,5% (w/v) NaCl
- LB-Medium, fest:
 - wie oben, außerdem 1,5% (w/v) Agar.
- Ampicillin, X-GAL, IPTG, Glycerin.

Klonierung und Isolierung der Plasmide

Die Vermehrung der *E. coli* Bakterien erfolgte in LB-Medium, dem 25µg/ml Ampicillin zugesetzt war. Dazu wurden in einem 250ml Erlenmeyer-Kolben 100ml des Mediums mit 10µl der Glycerinkulturen beimpft und für 15h bei 200rpm auf einem Schüttler bei 37°C inkubiert. Die Kulturen wurden in Zentrifugenbechern auf Eis abgekühlt und für 5min bei 4800xg zentrifugiert. Die Isolierung der Plasmide erfolgte mit dem Plasmid Midi Kit 100 der Firma Qiagen. Das erhaltene DNA-Pellet wurde in 100µl TE-Puffer gelöst und eine Konzentrationsbestimmung wie unter 2.1 beschrieben durchgeführt. Der Ertrag an Plasmid-DNA schwankte zwischen 30 und 130µg mit Reinheitsquotienten im optimalen Bereich.

Verwendete Chemikalien:

- LB-Medium, flüssig; Ampicillin (siehe oben).
- Plasmid Midi Kit 100 (Fa. Qiagen).
- TE-Puffer (wie unter 3.2.3).

Rückgewinnung der Inserts

Zur Rückgewinnung der Inserts wurde die rekombinierte Plasmid-DNA mit den jeweiligen Restriktionsenzymen (siehe Tab. 3.2) versetzt. Dazu wurden 10 units Enzym (Fa. Gibco BRL) pro µgDNA im Puffersystem nach Angabe des Herstellers zugegeben und für 5h bei 37°C inkubiert. Die elektrophoretische Auftrennung von Plasmid und Insert erfolgte mit einem UV Band-Elutor E91 der Firma Biometra. Dazu werden die Restriktionsansätze mit 6x Probenpuffer (vom Hersteller) und sterilem bi-dist. Wasser auf 160 µl in 1x Probenpuffer eingestellt. Die Agarosekonzentration und die anzulegende Spannung richten sich nach der Fragmentgröße (Herstellerangabe). Das Insert wird mit 230ml Fokussierlösung (vom Hersteller) in einer dafür vorgesehenen Geltasche aufgefangen und mit einer Pipette entnommen. Das Eluat wird mit 575µl 100%igem (v/v) Ethanol versetzt und die DNA über Nacht bei -20°C präzipitiert und 15min bei 9000xg zentrifugiert. Es folgen zwei Waschvorgänge mit 70%igem Ethanol und 5min Zentrifugation bei 9000xg. Das im Vakuum getrocknete DNA-Pellet wird in 200µl sterilem bi-dist. Wasser resuspendiert. Zur Konzentrationsbestimmung wurde eine Verdünnungsreihe mit ungeschnittener DNA des Phagen Lambda hergestellt (10, 20, 30, ... 100, 150ng) und neben 10µl der gelösten Insert-DNA in ein 0,8%iges Agarosegel mit 0,5µg/ml Ethidiumbromid aufgetragen. Unter UV-Licht (302nm) kann aus dem Vergleich der Leuchtintensität der Insertproben mit der Verdünnungsreihe die Konzentration der Insert-DNA geschätzt werden. Es konnten im Mittel über 1000ng Insert-DNA isoliert werden.

Verwendete Chemikalien:

- Restriktionsenzyme und Puffersysteme (Fa. Gibco BRL).
- Agarose, Ethidiumbromid, 1x TAE-Puffer (wie unter 3.2.2).
- Probenpuffer und Fokussierlösung (Fa. Biometra).
- 100%iges und 70%iges (v/v) Ethanol.
- *HindIII*-restringierte Lambda-DNA, Bromphenolblau-Ladepuffer (wie unter 3.2.2).

3.2.5 Radioaktive Markierung, Southern-Hybridisierung und Autoradiographie

Die Hybridisierung erfolgte in Glasröhren, die in einem Hybridisierungssofen (Fa. Bachofer) rotierten. Dazu werden pro Röhre bis zu drei Nylonmembranen in 30ml Hybridisierungslösung über Nacht bei 65°C prähybridisiert.

Die radioaktive Markierung der Sonden erfolgte mittels "random priming" mit dem Oligolabelling Kit der Fa. Gibco BRL. Dazu werden 50ng Sonden-DNA für 5min bei 95°C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Die Radioaktivität wird in Form von 1850MBq $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (Fa. Amersham, 110TBq/mmol) zugeführt, nachdem 15 μl des Reaktionspuffers, jeweils 2 μl der drei übrigen Oligos, 1 μl Klenow-Enzym ad 70 μl steriles bi-dist. Wasser hinzugefügt wurden. Der Ansatz wird für 3h bei 25°C inkubiert und anschließend die nicht inkorporierten Nukleotide mittels einer "Nucltrap Push Column" (Fa. Stratagene) abgetrennt. Vor und nach dem eigentlichem Ansatz wird die Säule mit 70 μl 1x STE gespült. Nach erneuter Denaturierung für 5min bei 95°C und 5min auf Eis wird das Eluat (100-140 μl) auf zwei Hybridisierungsröhren verteilt und diese im Hybridisierungssofen bei 65°C über Nacht inkubiert.

Zur Abtrennung der nicht spezifisch gebundenen Sonden-DNA werden die Membranen zweimal 15min mit 150ml 2x SSC, 0,5% SDS und einmal mit 1x SSC, 0,1% SDS bei 65°C gewaschen. Fuji RX-Röntgenfilme werden auf die in Frischhaltefolie eingeschweißten Membranen gelegt und bei -80°C für 2-14 Tage (entsprechend der verbliebenen Aktivität) exponiert. Nach Rehybridisierung der Membranen durch Aufkochen für 15min in 0,5% SDS können sie für weitere Southern-Hybridisierungen eingesetzt werden.

Verwendete Chemikalien:

- | | |
|---|------------------------------|
| - Hybridisierungslösung: | - 1x STE: |
| 0,25M NaHPO ₄ | 10mM Tris HCl |
| 0,25M NaCl | 100mM NaCl |
| 1mM EDTA | 1mM EDTA. |
| 7% (v/v) SDS | - 20x SSC (wie unter 3.2.3). |
| - Oligolabelling Kit (Fa. Pharmacia), $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (Fa. Amersham). | - Fuji-X-Ray Röntgenfilme. |
| - Nucltrap Push Columns (Fa. Stratagene). | |

3.3 Ergebnisse

3.3.1 Nachweis von fünf Cytoplasmatypen, die sich bezüglich ihrer mitochondrialen Genomorganisation unterscheiden

Bei der Restriktion von Gesamt-DNA entstehen so viele Fragmente, daß sie in den Agarosegelen nicht als einzelne Banden sichtbar sind. Bei gelungener Restriktion zeigen sich vielmehr gleichmäßig gefärbte Spuren. Die Identifizierung einzelner Fragmente erfolgt erst durch Southern-Hybridisierung mit den mitochondrialen Gensonden. Im folgenden sind solche Hybridisierungsmuster dargestellt.

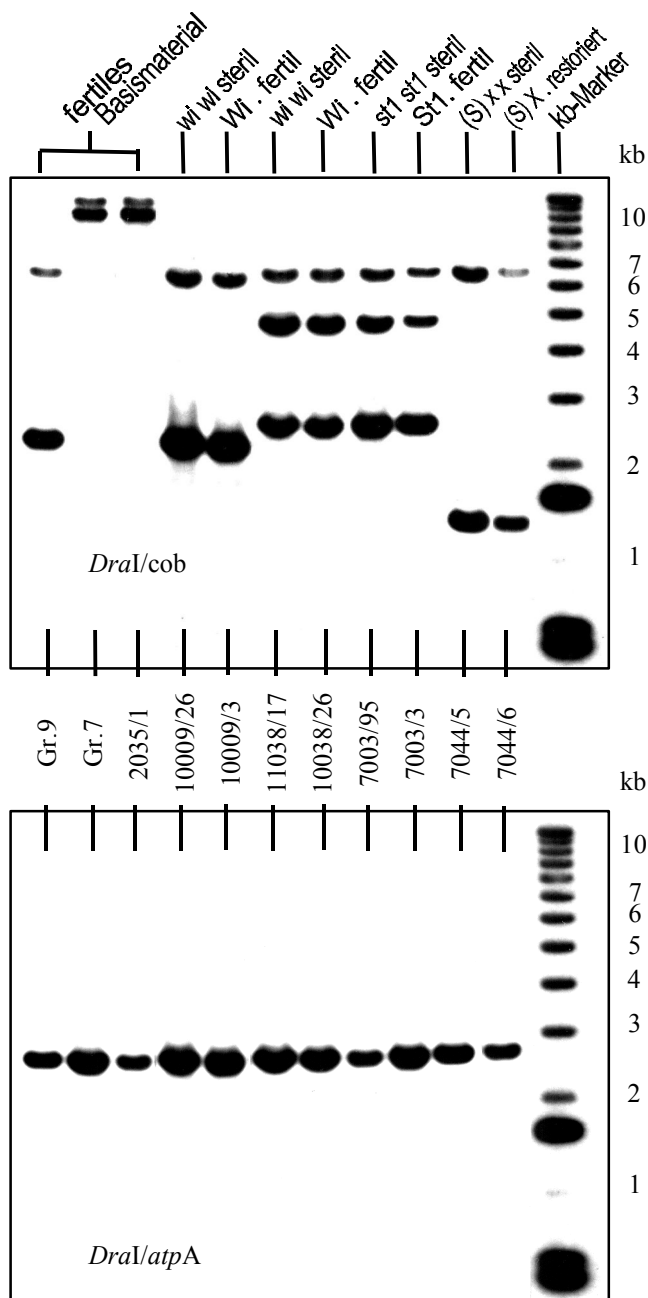


Abb. 3.3: Hybridisierungsmuster von fertilen Pflanzen des Basismaterials sowie von Pflanzen aus spaltenden Nachkommenschaften der *wi*- und der *st1*-Sterilität im Vergleich zu sterilen und restorierten CMS-Genotypen nach Restriktion mit *DraI* und Hybridisierung mit *cob* (oben) und *atpA* (unten).

wi-Sterilität sind aber Unterschiede zwischen den beiden Nachkommenschaften zu sehen. In den drei linken Spuren sind fertile Pflanzen des Basismaterials aufgeführt. Die Hybridisierungsmuster der Pflanzen Gr.7 und 2035/1 sind identisch, aber von den drei zuvor beschriebenen Mustern verschieden. Die Signale der Pflanze Gr.9 gleichen denen der Pflanzen der Linie 10009. Die im unteren Teil der Abbildung gezeigten Hybridisierungsmuster der Enzym/Sondenkombination *DraI/atpA* bei den gleichen Pflanzen lassen eine Differenzierung der vorliegenden Cytoplasmatypen nicht zu.

Nach Restriktion der Gesamt-DNA mit *DraI* und Hybridisierung der Sonde *cob* ergaben sich die in Abbildung 3.3 gezeigten Hybridisierungsmuster. Es lassen sich aufgrund der unterschiedlichen Mobilität der detektierten Restriktionsfragmente, sowie durch deren Zahl insgesamt fünf Cytoplasmatypen unterscheiden, von denen hier vier aufgeführt sind. Die beiden rechten Spuren (neben der kb-Leiter) zeigen die Hybridisierungssignale des Sterilitäts-cytoplasmas der CMS, die bei dem sterilen, (S)xx, und dem restorierten Genotyp, (S)X., identisch sind. Daneben sind die Hybridisierungsmuster der bezüglich der *st1*-Sterilität spaltenden Nachkommenschaft, sowie die zweier bezüglich der *wi*-Sterilität spaltenden Nachkommenschaften zu sehen. Unterschiede zwischen sterilen und fertilen Genotypen innerhalb dieser Nachkommenschaften treten nicht auf, bei der

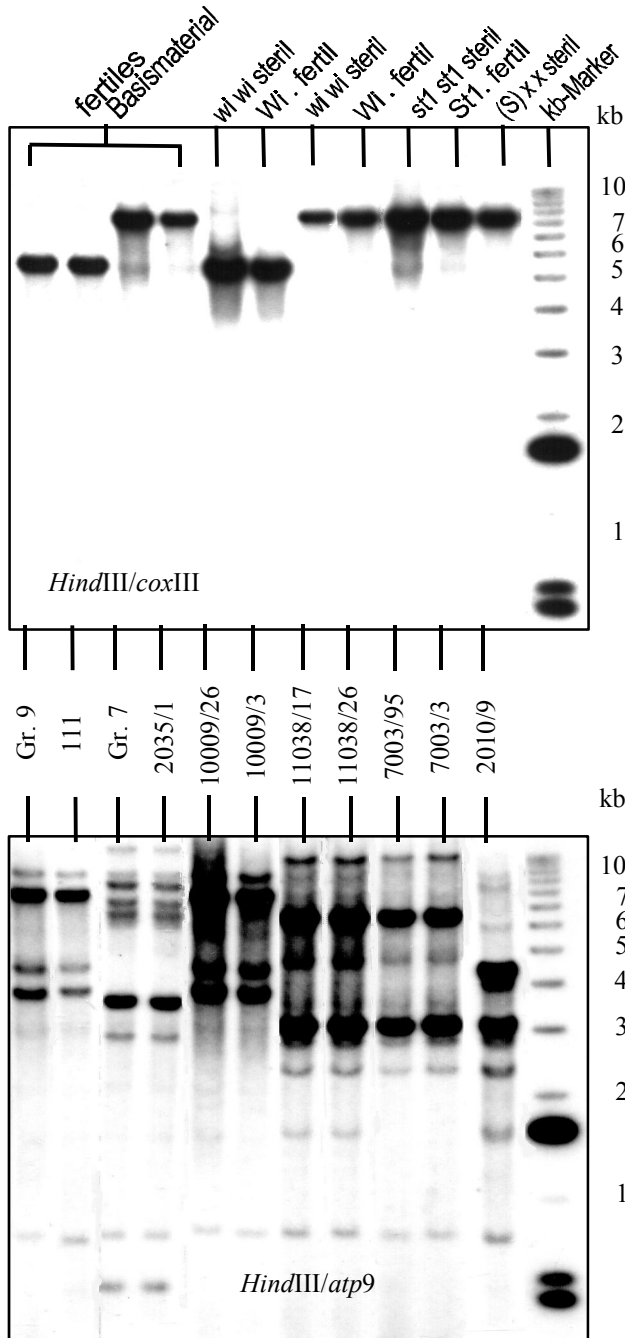


Abb. 3.4: Hybridisierungsmuster von fertilen Pflanzen des Basismaterials sowie von Pflanzen aus spaltenden Nachkommenschaften der *wi*- und der *st1*-Sterilität im Vergleich zu sterilen und restorierten CMS-Genotypen nach Restriktion mit *HindIII* und Hybridisierung mit *coxIII* (oben) und *atp9* (unten).

In der nebenstehenden Abbildung 3.4 sind Hybridisierungsmuster nach Restriktion der Gesamt-DNA mit *HindIII* und Hybridisierung mit den Sonden *coxIII* und *atp9* aufgeführt. Die Mobilität der von *coxIII* detektierten Fragmente bei Gr.7, 2035/1, den Linien 11038 und 7003 sowie der Pflanze 2010/9 unterscheidet sich nicht. Bei Verwendung anderer Sonden ergibt sich jedoch ein polymorphes Muster, das eine Unterscheidung der Cytoplasmotypen erlaubt. Als ein solches Beispiel ist das Hybridisierungsmuster von *atp9* gezeigt. Hier läßt sich das Sterilitätscytoplasma der CMS (rechte Spur neben der kb-Leiter) von dem Cytoplasma der Linien 7003 und 11038, dem Cytoplasma der Linie 10009 und von dem Cytoplasma der Pflanzen 2035/1 und Gr.7 unterscheiden. Das Hybridisierungsmuster bei Gr.9 und 111 gleicht dem der Linie 10009. Die Sonde *atp9* detektiert

deutlich mehr Fragmente als die übrigen verwendeten Sonden. Die Intensität der Signale ist sehr unterschiedlich. Die Abbildung macht jedoch deutlich, das bei den verschiedenen Einzelpflanzen mit identischen Hybridisierungsmustern, diese quantitativen Intensitätsunterschiede der einzelnen Fragmente konservativ und nicht zufällig sind.

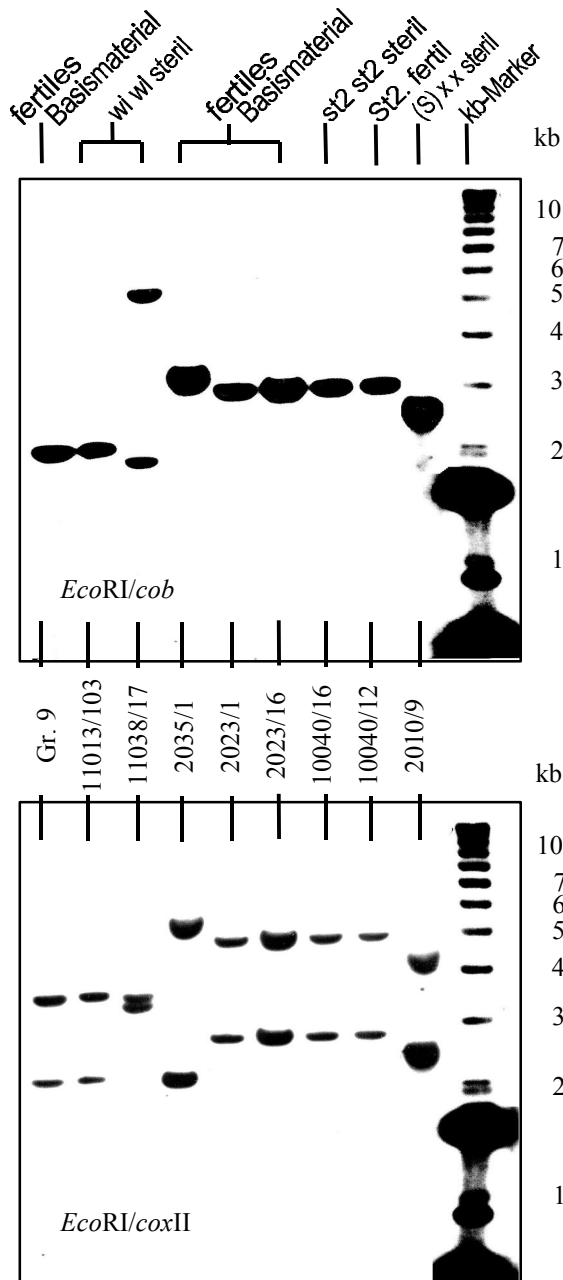


Abb. 3.5: Hybridisierungsmuster von fertilen Pflanzen des Basismaterials, *wi*-steriler Pflanzen und Pflanzen aus einer spaltenden Nachkommenschaft der *st2*-Sterilität im Vergleich zu einem CMS-Genotyp nach Restriktion mit *EcoRI* und Hybridisierung mit *cob* (oben) und *coxII* (unten).

In der nebenstehenden Abbildung 3.5 sind Hybridisierungsmuster nach Restriktion der GesamtdNA mit *EcoRI* und Hybridisierung mit den Sonden *cob* und *coxII* aufgeführt. In der rechten Spur (neben dem kb-Marker) ist das Hybridisierungsmuster des (S)-Cytoplasmas zu sehen, in den beiden folgenden Spuren das Hybridisierungsmuster zweier Pflanzen aus einer bezüglich der *st2*-Sterilität spaltenden Nachkommenschaft (10040). Zwischen der sterilen und fertilen Pflanze dieser Nachkommenschaft treten keine Unterschiede auf. Die beiden Pflanzen der Linie 2023 zeigen dazu identische Hybridisierungsmuster. Daneben sind bei 2035/1, 11038/17 und 11013/103 sowie Gr.9 die Hybridisierungsmuster der drei Cytoplasmotypen zu sehen, die bereits in den Abbildungen 3.3 und 3.4 differenziert wurden.

Alle durchgeführten Enzym/Sondenkombinationen bei den verschiedenen Einzelpflanzen sind tabellarisch im Anhang (Tabelle 11.1 und 11.2) aufgeführt. Es ließen sich insgesamt 5 Cytoplasmotypen unterscheiden. In Tabelle 3.3 sind die Einzelpflanzen diesen fünf Cytoplasmotypen zugeordnet.

Tab. 3.3: Zuordnung der untersuchten Einzelpflanzen zu den fünf Cytoplasmatypen

Cytoplasmatyp (1)	Cytoplasmatyp (2)	Cytoplasmatyp (3)	Cytoplasmatyp (4)	Cytoplasmatyp (5)
Pflanzen des fertilen Basismaterials sowie cytoplasmatisch männlich sterile und restorierte Pflanzen:				
W1115/47		Gr.7	2010/9 (S) _{xx}	2023/1
Gr.9		2035/1	7044/5 (S) _{xx}	2023/16
111			7044/6 (S) _X	4099/1
Spaltende Nachkommenschaften der <i>wi</i> , <i>st1</i> und <i>st2</i> -Sterilität:				
10009/26 <i>wiwi</i>	11038/17 <i>wiwi</i>			10040/16 <i>st2st2</i>
10009/3 <i>Wi</i> .	11038/26 <i>Wi</i> .			10040/12 <i>St2</i> .
11013/103 <i>wiwi</i>	7003/95 <i>st1st1</i>			
11013/64 <i>Wi</i> .	7003/3 <i>St1</i> .			
11061/20 <i>wiwi</i>				
11061/98 <i>Wi</i> .				

Das Sterilitätscytoplasma (S) des CMS-Systems wurde mit (4) bezeichnet. Die *wi*-Sterilität war im Cytoplasmatyp (1) aufgetreten und bereits durch Kreuzungen in den Cytoplasmatyp (2) eingelagert worden. Die *st1*-Sterilität liegt im Cytoplasmatyp (2) vor, die *st2*-Sterilität im Cytoplasmatyp (5). Bei dem fertilen Basismaterial konnten Pflanzen mit den Cytoplasmatypen (1) und (5) identifiziert werden und zusätzlich bei Gr.7 und 2035/1 der Cytoplasmatyp (3). Qualitative oder quantitative Unterschiede zwischen den Hybridisierungsmustern der Einzelpflanzen, die zu einem Cytoplasmatyp zusammengefaßt wurden, ergaben sich nicht.

3.4 Diskussion

3.4.1 Der methodische Ansatz

Southern-Hybridisierungen mit mitochondrialen Gensonden gegen Gesamt-DNA haben sich als eine effiziente Methode zur Unterscheidung verschiedener Cytoplasmatypen erwiesen. Die Isolierung der DNA kann mit der vorgestellten Methode aus Blüten und Blättern erfolgen. Bei Blüten ist jedoch ein größerer Anteil mitochondrialer DNA im Vergleich zur Kern- oder Chloroplasten-DNA zu erwarten. Tatsächlich sind die Hybridisierungssignale der DNA aus Blüten intensiver. Die von KRUG und FÖLSTER (1976) beschriebene Ruheinduktion im Herbst hat sich für die Blütenbildung als nachteilig erwiesen. Die Pflanzen zogen das Laub während der Wintermonate im Gewächshaus nicht vollständig ein, und die Blüte erfolgte im nächsten Frühjahr sehr ungleichmäßig. Pflanzen, bei denen die Ruheinduktion im Freiland erfolgt, können schon Anfang Januar wieder angetrieben werden und bilden in kurzer Zeit eine Vielzahl von Blüten. Dies erleichtert die Durchführung der Versuche erheblich.

Die Hybridisierung mit mitochondrialen Sonden gegen Gesamt-DNA ist gegenüber der Restriktion von mitochondrialer DNA methodisch einfacher. So wird weniger Pflanzen-

material benötigt, und eine klare Auswertung der Hybridisierungsmuster ist aufgrund der geringen Zahl der detektierten Fragmente möglich. Hinweise auf Hybridisierungen der mitochondrialen Sonden mit dem Kerngenom ergaben vergleichende Untersuchungen von Gesamt- und mitochondrialer DNA beim Spinat nicht (RUGE 1996). Zudem ist unwahrscheinlich, daß bei den Stringenzbedingungen für die Waschschrte und der Expositionszeit der Röntgenfilme Hybridisierungen mit Kern-DNA sichtbar sind, mindestens wären aber starke quantitative Unterschiede im Vergleich zu den mitochondrialen Signalen zu erwarten. Dies ist dadurch begründet, daß eine höhere Kopienzahl der DNA der Mitochondrien im Vergleich zur Zellkern-DNA vorliegt, die ausschließlich durch die zwei homologen Chromosomen repräsentiert wird. Weiterhin würden nicht bei allen Pflanzen eines Cytoplasmatyps identische Signale nachgewiesen, wenn diese durch Hybridisierungen mit dem Kerngenom bedingt wären, da in diesem Falle Aufspaltungen zu erwarten wären (insbesondere gilt dies für die in Kapitel 6 untersuchten Pflanzen, bei denen die Vererbung des mitochondrialen Genoms über zwei Generationen verfolgt wurde).

Der Informationsgehalt, der sich aufgrund der Auswertung der Hybridisierungen im Vergleich zur Sichtbarmachung der gesamten Restriktionsfragmente der mitochondrialen DNA nach Ethidiumbromidfärbung ergibt, ist geringer. Da aufgrund der geringen Empfindlichkeit dieser Färbetechnik jedoch größere Mengen mitochondrialer DNA zu isolieren sind, ist die Analyse von Einzelpflanzen mit dieser Methode in der Regel nicht möglich. Die Einzelpflanzenanalyse war für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen jedoch ein wichtiges Kriterium (vergl. 3.1). Ein Vorteil der Hybridisierungen für eine erste Unterscheidung von Cytoplasmatypen besteht darin, daß nur Bereiche des mitochondrialen Genoms berücksichtigt werden, die für dessen Informationsgehalt wichtig sind. Die nichtkodierenden Bereiche können jedoch für weiterführende Untersuchungen bedeutend sein, etwa für den Nachweis von sich wiederholenden Sequenzen ("repeats"). Eine bessere Möglichkeit zur Visualisierung mitochondrialer DNA-Fragmente konnten STEINBORN et al. (1992) durch radioaktive Endmarkierung der Restriktionsfragmente erreichen. Bei dieser Methode sind nur geringe Mengen (wenige Gramm) Pflanzenmaterial notwendig, um die Restriktionsfragmente der mitochondrialen DNA sichtbar machen zu können. Eine entsprechende Markierung der mitochondrialen DNA von Hunden mittels Biotinolyierung wurde von TSCHUIDA und IKEMOTO (1993) beschrieben und stellt eine sinnvolle Alternative zu den radioaktiven Nachweismethoden dar.

In den meisten Fällen ist nur ein indirekter Zusammenhang zwischen den nachgewiesenen Polymorphismen und einer sterilitätsinduzierenden Eigenschaft des Cytoplasmas gegeben, da die Umstrukturierungen oftmals größere Bereiche des mitochondrialen Genoms betreffen, und die gefundenen Polymorphismen folglich nicht ausschließlich auf CMS-spezifische Veränderungen zurückzuführen sind. In der praktischen Pflanzenzüchtung sind

solche unspezifischen Polymorphismen jedoch als Marker nutzbar, wenn in einer Population ein bestimmter Cytoplasmatyp selektiert werden soll. Gibt es Sonden, die mit einem Cytoplasmatyp hybridisieren, mit einem anderen jedoch nicht, kann ein "dot-blot"-Verfahren zur Differenzierung angewendet werden. Dies wurde von WEIHE et al. (1991) für die Zuckerrübe beschrieben. Dabei wird Pflanzenextrakt auf eine Membran getropft und hybridisiert. Aufgrund der Ja/Nein-Reaktion bezüglich der Schwärzung des Röntgenfilms können Normal- und Sterilitätscytoplasma unterschieden werden. Diese vereinfachte Hybridisierungsmethode erspart die DNA-Isolierung, Restriktion und Elektrophorese. Für weitere molekulare Untersuchungen ist es jedoch notwendig, die spezifischen Sequenzen eines Sterilitätscytoplasmas zu kennen.

Zunehmend gewinnen auch PCR-gestützte Methoden zur Unterscheidung von Cytoplasmatypen an Bedeutung, bei denen ein kausaler Zusammenhang zwischen nachgewiesenen Polymorphismen und der Sterilitätseigenschaft des Cytoplasmas nicht zwangsläufig vorliegen muß, die also ebenfalls als Marker angesehen werden können. Bei dem Sterilitätscytoplasma von *Allium cepa* wurde eine Insertion plastidärer DNA in der Nähe des 5'-Ende des *cob*-Gens nachgewiesen, von der Primer abgeleitet wurden, die zur Amplifikation eines im Vergleich zum Normalcytoplasma verschieden großen Fragments führen (SATO 1998). Bei *Beta vulgaris* (LORENZ et al. 1994), *Daucus carota* (NAKAJIMA et al. 1997) und *Sorghum bicolor* (JAISWAL et al. 1998) wurde die RAPD-Technik (mit Zufallsprimern) zur Unterscheidung verschiedener Cytoplasmatypen eingesetzt.

Die Sensitivität der PCR ist verglichen mit Southern-Hybridisierungen hoch. Wie in der Einleitung zu diesem Kapitel beschrieben wurde, kann die Kopienzahl der mitochondrialen DNA-Moleküle sehr unterschiedlich sein. Substöchiometrische Moleküle ("sublimons") sind mit den Hybridisierungen nur schwer nachweisbar. Solche schwach hybridisierenden Fragmente sind in Abb. 3.4 nach Hybridisierung mit der Sonde *atp9* zu sehen. Bei molekulargenetischen Untersuchungen können die "sublimons" zum Verständnis der Vererbung der Mitochondrien und von Rekombinationsereignissen von Bedeutung sein. Für die Selektion von Cytoplasmatypen sind die "sublimons" jedoch von untergeordneter Bedeutung, da sie keinen phänotypischen Einfluß besitzen und somit für die Unterscheidung von Normal- und Sterilitätscytoplasmen nicht von Bedeutung sind.

3.4.2 Die Variabilität des mitochondrialen Genoms vom Schnittlauch im Vergleich zu anderen Pflanzenarten

Bei der relativ geringen Zahl der untersuchten Pflanzen wurden in der vorliegenden Arbeit fünf Cytoplasmatypen nachgewiesen, die sich bezüglich der Organisation ihrer mitochondrialen Gene unterscheiden. Der Schnittlauch gehört demnach zu den Pflanzenarten, bei denen eine hohe Variabilität des mitochondrialen Genoms vorliegt. Verglichen damit scheint die Variabilität des mitochondrialen Genoms bei der zur gleichen Gattung gehörenden Zwiebel (*Allium cepa*) eher gering zu sein. Die genetische Kontrolle einer

CMS bei der Zwiebel wurde bereits 1943 durch JONES und CLARKE weitgehend charakterisiert. Die Autoren wiesen nach, daß die Sterilität auf einen cytoplasmatischen Faktor (S) zurückzuführen ist, und die Fertilität durch das Gen *Ms/ms* im dominanten Zustand restoriert wird. Neben dem (S) und dem Normalcytoplasma (N) wurde ein zweites Sterilitätsplasma (T) identifiziert (BERNINGER 1965), bei dem die Restoration entweder durch das dominante Allel am Locus *A/a* oder durch die komplementäre Wirkung der dominanten Allele an den Loci *B/b* und *C/c* kontrolliert wird (SCHWEISGUTH 1973). Bei dem Vergleich von mitochondrialen Restriktionsfragmenten und nach Southern-Hybridisierungen mit mitochondrialen Gensonden konnte das (S)-Cytoplasma eindeutig vom (N)- und (T)-Cytoplasma unterschieden werden (DE COURCEL et al. 1989; HOLFORD et al. 1991b). Die Autoren diskutieren eine alloplasmatische Herkunft des Sterilitätscytoplasmas (S). Die Einlagerung aus einer unbekanntem Art wird auch durch Untersuchungen des Chloroplastengenoms gestützt, bei denen in keiner nah verwandten Art der Zwiebel bestimmte plastidäre Restriktionsfragmente des (S)-Cytoplasmas nachgewiesen werden konnten, deren Existenz aber in einer triploiden viviparen Zwiebelhybride ('Pran') unbekanntem Ursprungs gezeigt wurde (HAVEY 1993). Eine eindeutige Unterscheidung des (N)- und des (T)-Cytoplasmas bezüglich der mitochondrialen Genomorganisation ist bisher nicht gelungen. Beide Cytoplasmen wurden von DE COURCEL et al. (1989) zu einer Gruppe (M) zusammengefaßt, in der sich zwar einige Unterschiede im Restriktionsfragmentmuster der mitochondrialen DNA finden ließen, eine eindeutige Zuordnung bestimmter Fragmente zu einem der beiden Cytoplasmatypen war aber nicht möglich (HOLFORD et al. 1991b). Auch das Chloroplastengenom von (T) und (N)- Cytoplasma ließ sich nicht unterscheiden, so daß hier wahrscheinlich eine auto-plasmatische Mutation zur Entstehung des Sterilitätscytoplasmas geführt hat (DE COURCEL et al. 1989; HOLFORD 1991b; HAVEY 1993). Zur Unterscheidung dieser Cytoplasmen wäre der Einsatz einer Endmarkierungsmethode der Restriktionsfragmente (vergl. 3.4.1) sinnvoll. Aufgrund der geringen Unterschiede zwischen dem mitochondrialen Genom von (T)- und (N)-Cytoplasma müßte bei einem genauen Vergleich der Fragmente dieser Cytoplasmen nach Restriktion der mitochondrialen DNA mit verschiedenen Endonukleasen eine Eingrenzung auf CMS-spezifische Unterschiede leicht möglich sein.

In anderen Pflanzenarten sind zum Teil eine Vielzahl von Cytoplasmen nachgewiesen worden. Insbesondere bei der Sonnenblume konnten von der eigens zu diesem Zweck gegründeten Arbeitsgruppe der FAO mehr als 40 CMS-Quellen nachgewiesen werden (SERIEYS 1996), von denen mindestens ein Teil verschiedene CMS-Mechanismen hat (HORN et al. 1996; HORN und FRIEDT 1997). Allerdings ist zu berücksichtigen, daß bei *Helianthus* die Mehrzahl der CMS-Systeme durch interspezifische Kreuzungen mit Wildarten entstanden ist. Es gibt jedoch auch Pflanzenarten, bei denen eine äußerst geringe Variabilität des mitochondrialen Genoms vorliegt. Zu diesen zählt der Spinat. Bei einer umfangreichen Untersuchung der mitochondrialen Genomdiversität von 25 verschiedenen

Herkünften, darunter *Spinacia tetrandra*, *S. turkestanica*, *S. oleracea* var. *inermis*, var. *spinosa* und var. *oleracea*, konnten nur bei sechs Herkünften Polymorphismen nachgewiesen werden, die sich zudem auf nur 1-3 Enzym/Sondenkombinationen beschränkten (RUGE 1996).

3.4.3 Übereinstimmungen bei der Entstehung von CMS-Sequenzen in verschiedenen Pflanzenarten

In der Einleitung zu diesem Kapitel wurde bereits darauf hingewiesen, daß die mitochondrialen Veränderungen in verschiedenen CMS-Systemen nicht völlig identisch sind. Im folgenden werden die bereits bekannten CMS-Sequenzen und ihre Entstehung beschrieben und anschließend diskutiert, ob es dennoch eine eventuelle Konformität gibt.

- Die TURF2H3-Sequenz im T-Cytoplasma vom Mais ist durch mindestens sieben Rekombinationsereignisse entstanden. Sie beinhaltet neben Sequenzabschnitten unbekannter Herkunft eine Teilsequenz der 5'-flankierenden Region des *atp6*-Gens, die wiederholt im mitochondrialen Genom des T-Cytoplasmas vorkommt, an die sich Sequenzen der 5'-flankierenden Region, der 3'-flankierenden Region sowie des kodierenden Bereichs des *rrn26*-Gens anschließen. Weiterhin sind Homologien zu einem Chloroplastengen für die tRNA von Arginin vorhanden und zwei offene Leserahmen, *orf13* und *orf25* (DEWEY et al. 1986). In fertilen Revertanten fehlt stets der *orf13*, während der *orf25* erhalten bleiben kann (WISE et al. 1987b; ROTTMANN et al. 1987, FAURON et al. 1990; FAURON et al. 1992). Folglich bedingt der *orf13* die CMS.
- Beim C- (Charrua) Cytoplasma vom Mais wird die *atp6*-C Sequenz als Ursache für die CMS diskutiert. Sie ist zusammengesetzt aus Teilsequenzen des *atp9*- und *atp6*-Gens sowie einem offenen Leserahmen unbekanntes Ursprungs (DEWEY et al. 1991).
- Die R-Sequenz im S- (USDA)-Cytoplasma beim Mais zeigt neben der Homologie zu den "inverted repeats" der S-Episome (vergl. 3.1) weitere Homologien zu Teilbereichen eines R1-Plasmids des (RU)-Cytoplasmas, zu einem M1-Plasmid von *Zea luxurians*, zum *atp9*-Gen und seiner 3'-flankierenden Region sowie zu einer 3'-flankierenden Region des *orf221* und beinhaltet letztlich Abschnitte ohne Homologie zu bekannten Sequenzen. Diese komplexe chimäre Sequenz enthält zwei offene Leseraster, von denen einer oder beide die CMS bedingen (ZABALA et al. 1997).
- Bei dem 'Polima'-Cytoplasma von *Brassica napus* wurde die chimäre Sequenz mit *orf224* bezeichnet (SINGH und BROWN 1991). Sie setzt sich aus Teilsequenzen des *orf158* (auch als *orfB* bezeichnet) und des *rps3*-Gens sowie einer weiteren nicht identifizierten Sequenz zusammen und wird mit dem *atp6*-Gen kotranskribiert (HANDA et al. 1995).

- Ein weiteres Sterilitätscytoplasma von *B. napus*, das 'Nap'-Cytoplasma, enthält einen *orf222*, der 79% Sequenzhomologie zum *orf224* des 'Polima'-Cytoplasmas besitzt und mit dem *nad5*-Gen kotranskribiert wird (L'HOMME et al. 1997).
- Da sowohl das 'Nap'- als auch das 'Polima'-Cytoplasma nicht zu einer stabilen Sterilitätsausprägung in *B. napus* führen (FAN und STEFFANSON 1986), wurde das nach OGURA (1968) benannte Sterilitätscytoplasma aus *Raphanus sativus* durch Protoplastenfusion in *B. napus* übertragen und bedingt auch in dieser Art männliche Sterilität (BANNEROT et al. 1974; PELLETIER et al. 1983). Zu dem CMS-induzierenden *orf138* des 'Ogura'-Cytoplasmas sind keine Sequenzhomologien gefunden worden (BONHOMME et al. 1992; KRISHNASAMY und MARKAROFF 1993).
- Der *orf263* des 'Tour'-Cytoplasma aus *B. tournefortii*, der in Verbindung mit den Kerngenomen von *B. juncea* und *B. napus* männliche Sterilität bedingt (alloplasmatisch), schließt sich an die 3'-Region des *atp6*-Gens an und enthält Sequenzhomologien zum *nad5*-Gen und zur downstream-Region des *atp9-1*-Gens aus dem 'Tokumasu'-Cytoplasma von *R. sativus* (LANDGREN et al. 1996).
- Bei der Petunie ist in dem *pcf*-Gen ("Petunia CMS associated fusion", YOUNG und HANSON 1987) eine Teilsequenz des *atp9*-Gens mit Abschnitten des *coxII*-Gens und einem undefinierten offenen Leserahmen (*urf-S*) verschmolzen. Das *pcf*-Gen wird mit dem *nad3*-Gen kotranskribiert (RASMUSSEN und HANSON 1989).
- Das von LECLERCQ (1969) beschriebene CMS-System von *Helianthus* ist nach einer interspezifischen Kreuzung von *H. petiolaris* und *H. annuus* entstanden. Die Unterschiede im Restriktionsfragmentmuster von Sterilitäts- (Pet1) und Normalcytoplasma beschränken sich auf einige wenige polymorphe Restriktionsfragmente, die durch etwa 17kb des mitochondrialen Genoms erklärt werden können (SICULELLA und PALMER 1988), die restlichen 94% der mitochondrialen DNA sind identisch. Die Isolierung dieses Genomabschnitts ergab eine 11kb-Inversion und eine 5kb Insertion bei dem Pet1- verglichen mit dem fertilen Cytoplasma. Die Insertionssequenz beinhaltet den *orfH522*, der homologe Sequenzabschnitte zum *orfB* und dem *atp9*-Gen sowie unbekannte Sequenzen enthält und mit dem *atpA*-Gen kotranskribiert wird (KÖHLER et al. 1991).
- Auch bei *Phaseolus vulgaris* schließt sich die sterilitätsbedingende Sequenz, ein 3,7kb-Abschnitt, an die 3'-Region des *atpA*-Gens an. Diese als *pvs*-Sequenz (*Phaseolus vulgaris* sterility) bezeichnete Region zeigt Homologien zu einer plastidären Transfer-RNA für Alanin, sowie zum *cob* und *coxII*-Gen und beinhaltet mehrere offene Leserahmen (CHASE und ORTEGA 1992; JOHNS et al. 1992).
- Beim CMS-Bo (Chinsura boro II) Reis besteht die *urf-rmc*-Sequenz aus dem 5' flankierenden und einem Teil des kodierenden Abschnitts des *atp6*-Gens. Die sich

anschließenden Sequenzen zeigen keine Homologie zu bekannten Genen (KADOWAKI et al. 1990). In späteren Untersuchungen wurde der Zusammenhang dieser Sequenz mit der CMS in Frage gestellt, da die Sequenz nicht in allen CMS-Pflanzen nachweisbar ist (IWABUCHI et al. 1993). Die Frage, ob die verschiedenen CMS-Linien die gleiche CMS bedingen, oder ob verschiedene Systeme vorliegen, ist in den genannten Artikeln nicht geklärt. In letzterem Falle müßten die Nachkommenschaften aus Kreuzungen der sterilen Pflanzen mit Restorer- und Maintainerlinien unterschiedliche Aufspaltungen ergeben. Statt einer solchen klärenden klassisch genetischen Analyse wurde eine zweite *atp6*-Sequenz als Ursache der CMS angenommen, deren kodierender Bereich sich nicht von dem *atp6*-Gen unterscheidet, deren Transkripte aber durch das Restorer-gen der untersuchten Linien beeinflusst (prozessiert und editiert) werden (IWABUCHI et al. 1993). Weiterhin wurde ein *orf79* beschrieben, der sich an die 3'-flankierende Region des *atp6*-Gens anschließt und homologe Bereiche zum *coxI* und *coxII*-Gen besitzt (AKAGI et al. 1994). Es könnte sein, daß der *orf79* mit dem *atp6*-Gen transkribiert wird und anschließend von diesem durch Prozessierung getrennt wird (PRING et al. 1998).

- In einem CMS-System von Sorghum, Typ 9E und A4, wurde ein im Vergleich zu anderen Cytoplasmen verändertes *coxI*-Gen nachgewiesen (BAILEY-SERRES et al. 1986).
- In einem anderen CMS-System bei Sorghum (IS1112C) ist der *orf107* mit der CMS assoziiert, der sich aus 5'-flankierenden und kodierenden Bereichen des *atp9*-Gens, aus 3'-flankierenden Bereichen des *atp6*-Gens und aus einem Bereich mit Homologien zu dem oben beschriebenen *orf79* aus Reis zusammensetzt (TANG et al. 1996a). In der gleichen CMS-Linie wurde eine weitere chimäre Region nachgewiesen, die homologe Bereiche zum *atp6/urf13* vom Mais hat, an die sich Teile des *urf209* und Sequenzen aus dem 5'-flankierenden Bereich des *atp6*-Gens anschließen. Die in dieser chimären Region liegenden *orf265* und *orf130* kommen nur in der genannten CMS-Linie vor, ein Einfluß des Restorergens auf die Transkription und damit ein inhaltlicher Zusammenhang mit der CMS konnte bisher nicht festgestellt werden (TANG et al. 1996b).
- Bei dem Cytoplasma aus *Triticum timopheevi*, das in Verbindung mit dem Zellkern von *Triticum aestivum* in der Weizenzüchtung als CMS-Quelle genutzt werden kann (WILSON und ROSS 1962), wird der *orf256* als Ursache der CMS diskutiert (RATHBURN und HEDGCOTH 1991). Dieser besitzt neben Sequenzen unbekannter Herkunft solche aus der 5'-flankierenden Region und dem kodierenden Bereich des *coxI*-Gens. Ein Einfluß des Restorergens auf die Transkripte wurde nicht nachgewiesen (SONG und HEDGCOTH 1994a), Antikörper gegen ein Polypeptid, das einem Teil der von dem *orf256* kodierten Aminosäuresequenz entspricht, detektierten ein 7kDa Protein, daß ausschließlich in den sterilen Pflanzen vorkommt (SONG und HEDGCOTH 1994b).

- Beim Owen-Sterilitätsplasma der Zuckerrübe werden Umstrukturierungen an den 5`-Enden des *atpA* und des *atp9*-Gens, die zu Differenzen im Transkriptmuster steriler und fertiler Pflanzen führen, als Ursache der CMS diskutiert (XUE et al. 1994).
- Bei *Lolium perenne* wurde beim Vergleich der Linie CMS9B290 mit der fertilen Linie LPSB21 ein zusätzlicher *orf-C9* nachgewiesen, der aus sechs Kodons des *atp9*-Gens und weiteren 118 Kodons einer unbekannt Sequenz besteht (KIANG und KAVANAGH 1996).

Beim Vergleich der aufgeführten CMS-Sequenzen fällt auf, daß Teile der kodierenden oder flankierenden Regionen sehr häufig aus den Genen des Komplexes V (ATP-Synthase-Komplex oder F_1F_0 -ATPase-Komplex) bestehen. Insbesondere gilt dies für das *atp9*-Gen, das beim C- und S-Mais, dem 'Tour'-Cytoplasma von *Brassica*, dem *pcf*-Gen der Petunie, dem *orf107* in IS1112C-*Sorghum* dem Pet1-Plasma von *Helianthus*, dem Owen-Plasma der Zuckerrübe, und bei *Lolium perenne* an der Entstehung der CMS beteiligt ist. Aber auch Bereiche des *atp6*- und des *atpA*-Gens sind häufig in den chimären CMS-Sequenzen enthalten, oder es erfolgt eine Kotranskription (*atp6*: T- und C-Mais, 'Polima'- und 'Tour'-Cytoplasma von *Brassica*, 'Bo'-Reis, *orf107* in IS1112C-*Sorghum*; *atpA*: Pet1-Cytoplasma bei *Helianthus*, *Phaseolus vulgaris*, Owen-Plasma der Zuckerrübe und bei alloplasmatischen *Nicotiana*-Hybriden (HAKANSSON und GLIMELIUS 1991)).

Beim Schnittlauch ist die Bestimmung einer CMS-induzierenden Sequenz noch nicht erfolgt. Dennoch erscheint es nach dem Vergleich der fünf Cytoplasmatypen bezüglich ihrer Hybridisierungssignale wahrscheinlich, daß auch beim Schnittlauch das *atp9*-Gen an der Entstehung einer solchen Sequenz beteiligt sein könnte. Bei allen Cytoplasmatypen hybridisiert das *atp9*-Gen mit einer deutlich höheren Zahl an Fragmenten als alle übrigen Sonden (vergl. Abb. 3.4). Daraus folgt, daß das *atp9*-Gen oder Teilsequenzen dieses Gens in einer höheren Kopienzahl im mitochondrialen Genom des Schnittlauchs als die übrigen untersuchten Gene vorkommt. Dies weist auf eine hohe Rekombinationshäufigkeit dieses Gens hin.

Als Hinweis, daß das *atp9*-Gen tatsächlich häufiger von Rekombinationsereignissen betroffen ist als die übrigen Gene der Mitochondrien, können auch Untersuchungen an verschiedenen *Brassica*-Cybriden von LANDGREN und GLIMELIUS (1994) gewertet werden. Diese durch Protoplastenfusion erzeugten intragenerischen (innerhalb der Gattung *Brassica*) und intergenerischen (innerhalb der Familie Brassicaceae) Hybriden zeigten spezifische DNA-Fragmente, die bei den Ausgangspflanzen nicht vorhanden und folglich durch Rekombinationen entstanden sind. Bei den verschiedenen Hybriden waren 40 - 86% der Fragmente mit dem *atp9*-Gen assoziiert und 29-80% mit dem *atpA*-Gen. Zum Vergleich waren die Gene *cob* und *coxII* gar nicht und das *rrn18*-Gen nur mit 0-5% an der Bildung neuer Fragmente beteiligt. Ähnliche Ergebnisse erzielten WALTERS und EARLE (1993) bei der Untersuchung von *Brassica oleracea* Kalli nach Protoplastenfusion mit dem

'Ogura'-Cytoplasma. Von 258 untersuchten Kalli zeigte etwa ein Drittel Rekombinationen in einer Region nahe des *atp9*-Gens.

Die höhere Rekombinationshäufigkeit bestimmter Abschnitte des mitochondrialen Genoms im Vergleich zu anderen kann entweder durch eine höhere Kopienzahl dieser Abschnitte bedingt sein, oder durch spezifische Sequenzen, die die Rekombination fördern. Jedoch führen nicht alle "repeats" zwangsläufig zu Rekombinationsereignissen. In der Petunienlinie 3704 und in *Raphanus sativus* liegt das *atp9*-Gen zweimal vor, Hinweise auf eine Rekombination zwischen diesen homologen Sequenzen fehlen aber (ROTHENBERG und HANSON 1987; MARKAROFF und PALMER 1988). Ebenso rekombinieren "repeats" im mitochondrialen Genom der Petunie nicht (PRUITT und HANSON 1989). Auch in *Oenothera berteriana* existieren entsprechende nicht rekombinierende Sequenzen (SCHUSTER und BRENNICKE 1987). Warum manche "repeats" im Gegensatz zu anderen zur Entstehung von Subgenomen führen, ist bislang ungeklärt. HANSON und FOLKERTS (1992) diskutieren verschiedene Theorien: Die ständige Neubildung von Subgenomen durch aktive Rekombination von "long repeats" ist nur ein Modell. Ebenso könnte die Rekombination ein eher zufälliges Ereignis sein, und die Erhaltung der Subgenome dann durch autonome Replikation erfolgen. (Auch die Erhaltung der "Chromosomen", die durch Rekombination von "short repeats" entstanden sind, wird mit autonomer Replikation der Subcircle erklärt, vergl. 3.1.) Als Alternative diskutieren HANSON und FOLKERTS spezifische Sequenzen, die zu aktiven Rekombinationsereignissen führen. Sollte es solche spezifischen Sequenzen geben, können diese aber nur wenige Basenpaare umfassen, da ein Vergleich verschiedener rekombinierender "repeat"-Gruppen keine Hinweise auf homologe Abschnitte zwischen diesen Gruppen liefert. HANSON und FOLKERTS ergänzen, daß diese kurzen spezifischen Sequenzen vielleicht nur in größeren homologen Bereichen wirksam werden.

Eine andere Möglichkeit das gehäufte Auftreten der Gene des Komplexes V in Verbindung mit den CMS-Sequenzen zu erklären, besteht in der Annahme, daß Mutationen dieser Gene toleriert werden, während Mutationen anderer Gene eher letal wirken. Über die Funktion der Proteine, die von den CMS-spezifischen Sequenzen kodiert werden, ist wenig bekannt. In der Regel liegen aber von den Genen, aus denen sich die CMS-Sequenzen zusammensetzen, noch intakte Kopien vor, so daß die CMS nicht auf einem Informationsverlust beruht, sondern durch zusätzlich gebildete Proteine entsteht (einzige Ausnahme ist der Verlust von Teilen des *nad7*-Gens bei *Nicotiana sylvestris*, vergl. 3.1). Diese zusätzlichen Proteine werden vielleicht eher toleriert, wenn sie Eigenschaften der Proteine des Komplexes V haben. Möglicherweise können Kerngene, die regulatorisch auf die mitochondrial kodierten Proteine des Komplexes V wirken, auch die chimären CMS-spezifischen Proteine beeinflussen. Dies würde erklären, warum es in den verschiedenen Pflanzenarten und bei Vorliegen verschiedener CMS-Sequenzen in der Regel Kerngene gibt, die mit diesen Sequenzen interagieren können, so daß Sterilität oder Fertilität

ausgeprägt wird. Beispielsweise sind bei der Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) Kerngene bekannt, die eine Funktion bei der Translationsregulierung (*aep2* = *atp13*) und bei der Stabilisierung (*aep1* = *nca1*) des Produkts des *atp9*-Gens haben (LAW et al. 1995). Ob solche Kerngene tatsächlich auch eine regulatorische Wirkung auf die CMS-Sequenzen besitzen und somit indirekt die Etablierung solcher Sequenzen in den verschiedenen Pflanzenarten ermöglicht haben, müssen künftige Forschungsergebnisse zeigen.

Neben einer indirekten Anhäufung von Rekombinationsprodukten durch die Kontrolle ihrer Transkription oder Translation ist auch ein direkter Einfluß von Kerngenen auf die Organisation der mitochondrialen Gene denkbar. Solche Kerngene, die direkt die mitochondriale Genomorganisation beeinflussen können, werden in Kapitel 6.4 beschrieben.

4 Klassisch genetischer Nachweis von CMS und GMS durch Einlagerung kerngenetischer Sterilitätsfaktoren in verschiedene Cytoplasmatypen

4.1 Einleitung

Neben dem CMS-System, das in Kapitel 1 beschrieben wurde, konnten zunächst in der Sorte 'Wilau' (RAUBER 1989) und später sowohl in einer Maintainer-Selbstungsnachkommenschaft als auch in einer dänischen Provenienz sterile Pflanzen ausgelesen werden (POTZ 1992). Zur Klärung der Vererbung dieser mit *wi*-, *st1* und *st2* bezeichneten Sterilitäten wurden vor Beginn der vorliegenden Arbeit sterile Pflanzen mit Maintainern des CMS-Systems bestäubt. Da in der F₁ ausschließlich fertile Pflanzen auftraten, handelt es sich bei den Sterilitäten nicht um die bekannte CMS. In der F₂ wurden Aufspaltungen steriler und fertiler Pflanzen im Verhältnis 1:3 festgestellt, so daß in den Ursprungscytoplasmen für alle drei Sterilitäten ein monogen rezessiver Erbgang angenommen werden muß (TATLIOGLU 1994). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Selbstungen fertiler F₂-Pflanzen durchgeführt, um den monogenen Erbgang in der F₃ zu bestätigen und um dominante und heterozygote F₂-Pflanzen unterscheiden zu können. Weiterhin wurden Komplementationstests vorgenommen, um nachzuweisen, daß es sich tatsächlich um drei verschiedene Sterilitätsloci handelt und nicht um allelische Zustände eines Gens. Bei der *wi*- und der *st1*-Sterilität waren bereits vor Beginn der vorliegenden Arbeit entsprechende Kreuzungen zwischen rezessiven, also sterilen Genotypen der einen Sterilität und heterozygoten Genotypen der anderen Sterilität durchgeführt worden. Da sich die Genotypen in den Nachkommenschaften zum fertilen Wildtyp komplementieren konnten, war somit bekannt, daß diese Sterilitäten durch verschiedene Loci bedingt werden (TATLIOGLU 1994). In der vorliegenden Arbeit wurden ergänzend Komplementationstests zwischen den entsprechenden Genotypen der *wi*- bzw. der *st1*-Sterilität und denen der *st2*-Sterilität durchgeführt.

Um weiterhin zu klären, ob zusätzlich cytoplasmatische Faktoren an der Ausprägung der drei Sterilitäten beteiligt sind, wurden die kerngenetischen Sterilitätsfaktoren in die in Kapitel 3 beschriebenen Cytoplasmen eingelagert. Dies erfolgte entsprechend dem Kreuzungsmodell aus Abbildung 4.1. Dazu wird der weibliche Elter als Träger des neuen Cytoplasmas kastriert und durch eine am Sterilitätslocus heterozygote Pflanze bestäubt. Die F₁-Generation besteht aus fertilen Pflanzen, die unter der Voraussetzung der

maternalen Vererbung das neue Cytoplasma tragen, und von denen die Hälfte heterozygot am kerngenetischen Sterilitätslocus sind. In der F_2 treten folglich in den Nachkommenschaften dieser heterozygoten F_1 -Pflanzen sterile Pflanzen im Verhältnis 1:3 auf, wenn der kerngenetische Sterilitätsfaktor auch in diesem neuen Cytoplasma die Sterilität ausprägen kann. Wird die beschriebene Aufspaltung steriler und fertiler Pflanzen in der F_2 nicht beobachtet, so muß ein cytoplasmatischer Erbfaktor vorhanden sein, und es liegt ein CMS-System vor. In diesem Falle ist das neue Cytoplasma ein Maintainer-Cytoplasma.

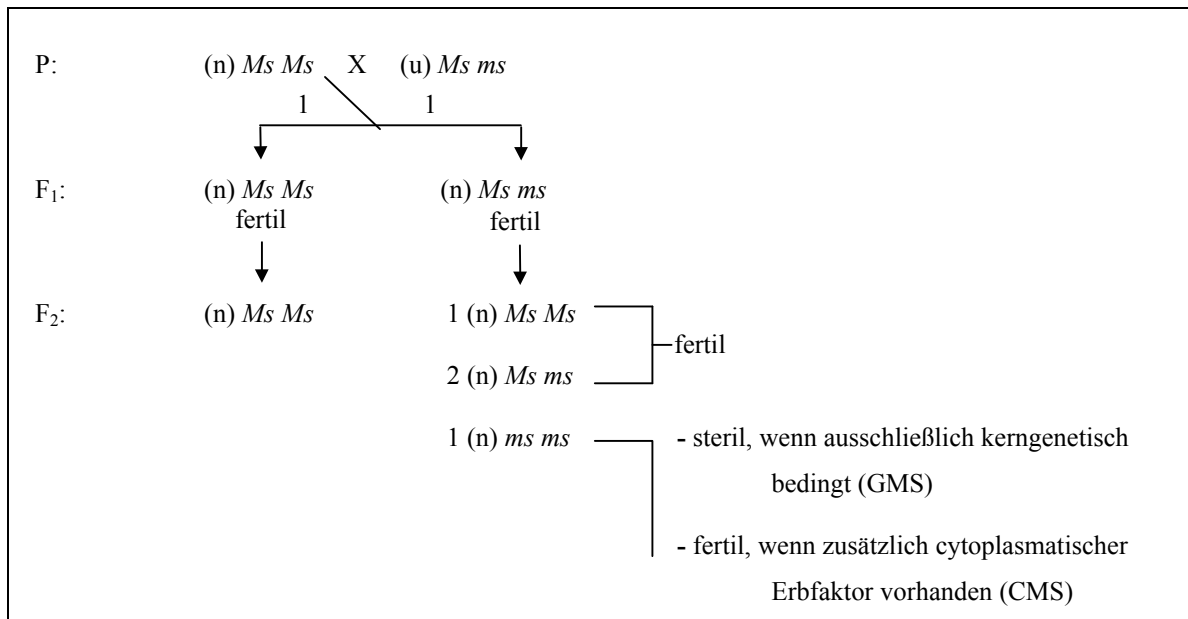


Abb. 4.1: Kreuzungsschema zur Einlagerung eines kerngenetischen Sterilitätsfaktors Ms/ms aus dem Ursprungscytoplasma (u) in ein neues Cytoplasma (n).

Um weitere Informationen über die bei den Einlagerungen verwendeten maternalen Eltern zu gewinnen, wurden diese zusätzlich mit Temperatur-insensitiven CMS-Pflanzen gekreuzt und Selbstungen durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen liefern Auskunft über eventuell vorliegende weitere rezessiv vererbte Sterilitätsgene und über die Konstitution dieser Pflanzen bezüglich des Restorergens X/x sowie des Temperatur-insensitiven Restorergens T/t .

4.2 Material und Methoden

4.2.1 Pflanzenmaterial

Zur Bestätigung der monogen rezessiven Vererbung der kerngenetischen Sterilitätsfaktoren wi , $st1$ und $st2$ in den jeweiligen Ursprungscytoplasmen wurden in spaltenden Nachkommenschaften (F_2) Selbstungen der fertilen Pflanzen vorgenommen:

- für die wi -Sterilität in der Linie 11013
- für die $st1$ -Sterilität in der Linie 10053
- für die $st2$ -Sterilität in der Linie 10040.

Zur Durchführung der Komplementationstests wurden rezessive und heterozygote Genotypen der drei Sterilitäten ausgewählt:

- *wi*-Sterilität: rezessiver Genotyp: 10015/58
heterozygoter Genotyp: 8015/65
- *st1*-Sterilität: rezessive Genotypen: 10053/25, 27, 39
heterozygote Genotypen: 9001/11, 9002/9
- *st2*-Sterilität: rezessiver Genotyp: 10040/67
heterozygote Genotypen: 10040/4, 11, 17, 22, 26 37, 47, 52, 58.

Die bezüglich der *wi*- bzw. *st1*-Sterilität heterozygoten Genotypen 8015/65, 9001/11 und 9002/9 sind F₁-Pflanzen aus Kreuzungen steriler Pflanzen mit Maintainern der CMS. (TATLIOGLU 1994). Die rezessiven Genotypen der drei Sterilitäten (10015/58, 10053/25, 27, 39 und 10040/67) sind den spaltenden F₂-Generationen entnommen. Die heterozygoten Genotypen der bezüglich der *st2*-Sterilität spaltenden F₂-Linie 10040 wurden von den homozygot dominanten Genotypen dieser Nachkommenschaft unterschieden, indem Selbstungen durchgeführt, und die F₃ analysiert wurde.

Zur Einlagerung in andere Cytoplasmen dienten als maternale Eltern solche Pflanzen, die verschiedene mitochondriale Genomorganisationen aufwiesen (vergl. Kapitel 3). Als paternale Eltern wurden Genotypen verwendet, die bezüglich einer der drei kerngenetischen Sterilitätsfaktoren heterozygot sind (zur Begründung für die Heterozygotie der verwendeten Pflanzen vergl. Pflanzenmaterial für die Komplementationstests). In Kapitel 3 waren Selbstungsnachkommenschaften dieser Genotypen bezüglich ihrer mitochondrialen Genomorganisation untersucht worden. Unter der Voraussetzung einer stabilen Vererbung der Mitochondrien konnte angenommen werden, daß die hier verwendeten Genotypen die gleiche mitochondriale Genomorganisation haben wie ihre Selbstungsnachkommen. Dies wird durch Southern-Hybridisierungen in Kapitel 6 bestätigt.

- maternale Eltern: Cytoplasmatyp (1): Gr.9
Cytoplasmatyp (3): 2035/1
Cytoplasmatyp (5): 2023/14.
- paternale Eltern: (1) *Wi wi*: 8015/65
(2) *St1 st1*: 9001/11, 9002/4
(5) *St2 st2*: 9046/6.

4.2.2 Durchführung der Kreuzungen

Zur Durchführung von Kreuzungen wurden die Pflanzen aus dem Freiland im Gewächshaus aufgestellt und nach einer ein- bis zweiwöchigen Akklimatisierung bei 20°/16°C (Tag/Nacht) und Zusatzlicht für 12 Stunden am Tag kultiviert. Um die Nachkommenschaften in einer möglichst langen Vegetationsperiode wachsen lassen zu können, wurden

die Kreuzungen schon in den Monaten März bis Mai durchgeführt. Dazu wurden die Knospen aller zu kreuzenden Pflanzen (maternale und paternale Eltern) vor dem Aufblühen in perforierten Plastiktüten isoliert, um eine Fremdeinstäubung zu verhindern. Männlich fertile Mutterpflanzen wurden bei Öffnen der Spata kastriert, indem mit einer Pinzette die Blüten- und Staubblätter entfernt wurden. Aufgrund der unterschiedlichen Entwicklung der Einzelblüten einer Dolde wurden nach zwei Tagen die Kastrationen an den nachwachsenden Knospen fortgeführt und verbliebene, zu kleine Knospen ganz entfernt. Die Bestäubung bei Kreuzungen und Selbstungen erfolgte mit Pinseln, die zuvor mit 70%igem Ethanol gereinigt wurden. Nach zwei Tagen wurde dies wiederholt, und die Blüten verblieben anschließend für vier bis sechs Wochen in den Isolierhauben, bis die Samenkapseln aufsprangen. Die Dolden wurden dann abgekniffen und in Papiertüten für etwa zwei weitere Wochen getrocknet. Noch in den Kapseln befindliches Saatgut wurde mit einer Pinzette herausgelöst. Die Aussaat erfolgte in Pikiererde. Die Samen keimten nach vier bis zehn Tagen und wurden nach etwa drei Wochen in 3:1 Erde in 35er Quickpott-Paletten (5 x 5cm) pikiert. Nach dem Anwachsen wurden die Nachkommen im Freiland aufgestellt und dort überwintert. Die Blüte im nächsten Frühjahr erfolgte im Freiland ab Ende Mai, im Gewächshaus war eine Verfrühung bis in den März möglich. Bei Aussaaten, die erst im August erfolgten, wurde die juvenile Phase bis zur Ruheinduktion teilweise nicht mehr überschritten, so daß diese Pflanzen im folgenden Frühjahr nicht oder erst sehr spät blühten.

4.2.3 Bonitur der Blüten

Die Bonitur der Blüten erfolgte nach einem Boniturschema von TATLIOGLU (1982): Männlich sterile Blüten wurden dabei mit 0, voll fertile Blüten mit 4 bonitiert. Bei semisterilen Blüten wurde eine Abstufung vorgenommen, indem den Blüten, die nicht sicher als steril zu bonitieren waren, die Stufe 1 zugeordnet wurde, und partiell sterile Blüten mit eindeutiger Pollenbildung nach der Anzahl fertiler Antheren die Stufen 2 (bis zu 60% fertile Antheren) und 3 (61-99% fertile Antheren) erhielten.

4.2.4 Statistische Auswertung

Die Fragestellung, ob eine beobachtete Aufspaltung signifikant von einem erwarteten Spaltungsverhältnis abweicht, wird mittels Durchführung eines χ^2 -Tests überprüft. Der χ^2 -Wert wird bei einer Klassenzahl von 2 (sterile und fertile Klasse) durch die folgende Formel berechnet:

$$\sum_{i=1}^2 \frac{(|B_i - E_i| - 0,5)^2}{E_i}$$

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

Das Kontinuitätskorrekturglied 0,5 wird nach YATES (in WEBER 1986) bei einer Klassenzahl von 2 und einer Stichprobengröße zwischen 25 und 200 angewendet, um eine bessere

Anpassung der diskreten Werte an die stetige χ^2 -Verteilung zu erreichen. Ist die Stichprobengröße größer als 200, wird das Korrekturglied weggelassen. Bei einer Stichprobengröße kleiner als 25 sollte nach WEBER (1986) der FISHER-Test angewendet werden. Nach SACHS (1978) sollten für die Anwendung des χ^2 -Tests die erwarteten Häufigkeiten, die sich aufgrund der Stichprobengröße ergeben, nicht unter 4 liegen. Da diese Bedingung für die Aufspaltungen in den nachfolgenden Abschnitten in der Regel erfüllt ist, wird auch bei Stichprobengrößen kleiner als 25 der χ^2 -Test zur Überprüfung der Anpassung der beobachteten Spaltungsverhältnisse an das jeweils erwartete Verhältnis angewendet.

Der χ^2 -Wert, der zu einer signifikanten Ablehnung eines angenommenen Spaltungsverhältnisses führt, ist bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 0,05$ und einem Freiheitsgrad (Klassenzahl - 1) 3,84. Die Irrtumswahrscheinlichkeit gibt die Wahrscheinlichkeit für einen Fehler erster Art an, daß heißt in 5% der betrachteten Stichproben wird das erwartete Verhältnis abgelehnt, obwohl die Grundgesamtheit dem erwarteten Verhältnis entspricht. Wird α kleiner gewählt, beispielsweise 0,01, so nimmt der Fehler erster Art ab, im vorliegenden Fall vergrößert sich der χ^2 -Wert, der zur Ablehnung eines geforderten Spaltungsverhältnisses führt, auf 6,62. Allerdings wird dies mit einer Zunahme des Fehlers zweiter Art erkauft, der zur Annahme eines Spaltungsverhältnisses führt, obwohl die Grundgesamtheit diesem Spaltungsverhältnis nicht entspricht. In der vorliegenden Arbeit wird eine Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 0,05$ festgelegt und folglich solche beobachteten Aufspaltungen als signifikant verschieden von einem erwarteten Spaltungsverhältnis gewertet, deren χ^2 -Wert größer als 3,84 ist.

Die Wahrscheinlichkeit mit der eine Stichprobe als nicht spaltend interpretiert wird, obwohl in der Grundgesamtheit eine Aufspaltung vorliegt, ist zum einen von der Stichprobengröße, zum anderen von dem tatsächlichen Spaltungsverhältnis abhängig. Die Wahrscheinlichkeit, daß ein tatsächlich vorliegendes Spaltungsverhältnis als nicht spaltend interpretiert wird, ergibt sich aus dem Binom $(a+b)^n$, wobei a und b die relativen Häufigkeiten und n die Stichprobengröße darstellt. Wird dies auf ein 1:3-Verhältnis steriler zu fertiler Pflanzen angewendet, folgt $(0,25+0,75)^n$. Die Irrtumswahrscheinlichkeit, daß also bei einer Stichprobe dieser Grundgesamtheit ausschließlich fertile Pflanzen beobachtet werden, beträgt $P = (3/4)^n$. Entsprechend beträgt die Irrtumswahrscheinlichkeit, daß ein 1:1-Spaltungsverhältnis als nicht spaltend interpretiert wird $P = (1/2)^n$. Soll die Irrtumswahrscheinlichkeit weniger als 5% betragen, so muß die Stichprobengröße entsprechend groß gewählt werden. Zur Ablehnung eines 1:1-Spaltungsverhältnisses ist dazu eine minimale Stichprobengröße von 5 Pflanzen notwendig, zur Ablehnung eines 1:3-Spaltungsverhältnisses müssen mindestens 11 Pflanzen bonitiert werden.

4.3 Ergebnisse

4.3.1 Bestätigung der monogen rezessiven Vererbung der kerngenetischen Sterilitätsfaktoren *wi*, *st1* und *st2* in ihren Ursprungscytoplasmen (1), (2) bzw. (5)

In der folgenden Tabelle sind die Kreuzungsanalysen zur Vererbung der drei Sterilitäten *wi*, *st1* und *st2* in ihren jeweiligen Ursprungscytoplasmen zusammengefaßt. Dabei wurden frühere Ergebnisse (F₁ und F₂; TATLIOGLU 1994 und persönliche Mitteilung) durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Analyse der F₃ ergänzt. Es ist jeweils die Anzahl der Nachkommenschaften angegeben, sowie die Summen der sterilen bzw. fertilen Pflanzen, die in diesen Nachkommenschaften bonitiert wurden.

Tab. 4.1: Zusammenfassende Darstellung der Spaltungsanalysen in den F₁-, F₂-, und F₃-Generationen von Kreuzungen steriler Pflanzen mit Maintainer-Genotypen des CMS-Systems

Herkunft der Sterilität		Zahl der Nachkommenschaften	Aufspaltung sterile : fertile		χ^2 -Wert	Vererbung	
Sorte 'Wilau'	F ₁	3	-	98	0,06 (1 : 3)	nicht CMS-identisch	
	F ₂	13	63	196			
	F ₃	nicht spaltend: 6 spaltend: 6	-	130	29	64	1,58 (1 : 3) ^a
Linie 7003	F ₁	3	-	93	0,68 (1 : 3) ^a	nicht CMS-identisch	
	F ₂	4	27	99			
	F ₃	nicht spaltend: 3 spaltend: 7	-	76	35	114	0,14 (1 : 3) ^a
Linie 5533	F ₁	2	-	39	0,01 (1 : 3)	nicht CMS-identisch	
	F ₂	6	66	199			
	F ₃	nicht spaltend: 10 spaltend: 14	-	202	83	244	0,03 (1 : 3)

^a) χ^2 -Wert bei weniger als 200 Pflanzen mit Kontinuitätskorrektur nach YATES berechnet (vergl. 4.2.4)

Die monogen rezessive Vererbung der drei Sterilitäten *wi*, *st1* und *st2* in ihren jeweiligen Ursprungscytoplasmen wird durch die aufgetretenen Spaltungsergebnisse der F₃ bestätigt. Die Summen steriler bzw. fertiler Pflanzen der spaltenden Nachkommenschaften weichen nicht signifikant von dem erwarteten 1:3 (steril : fertil) Verhältnis ab (χ^2 -Werte sind in der Tabelle 4.1 angegeben). Die gefundenen Verhältnisse von spaltenden zu nicht spaltenden Nachkommenschaften zeigen tendenziell ebenfalls das erwartete Verhältnis von 2:1.

4.3.2 Komplementationstests

Vor Beginn der vorliegenden Arbeit war bekannt, daß die Sterilitäten *wi* und *st1* durch verschiedene Genorte bedingt werden (TATLIOGLU 1994). In der Tabelle 4.2 sind die Ergebnisse von Komplementationstests zwischen diesen beiden Genen und dem *st2*-Gen dargestellt.

Tab. 4.2: Komplementationstests zwischen dem *st2*-Gen und den Genen *wi* und *st1*

Kreuzung mit den Genotypen	verwendete Einzelpflanzen	Spaltung in der F ₁ sterile : fertile	
<i>St2 st2</i> x <i>Wi wi</i>	10040/37 x 8015/65	-	16
	10040/58 x 8015/65	-	17
<i>wi wi</i> x <i>St2 st2</i>	10015/58 x 10040/22	-	33
<i>St2 st2</i> x <i>St1 st1</i>	10040/4 x 9002/9	-	33
	10040/26 x 9001/11	-	26
	10040/47 x 9002/9	-	34
<i>st2 st2</i> x <i>St1 st1</i>	10040/67 x 9001/11	-	29
<i>st1 st1</i> x <i>St2 st2</i>	10053/25 x 10040/52	-	27
	10053/27 x 10040/11	-	15
	10053/39 x 10040/17	-	34

In den Nachkommenschaften treten nur fertile Pflanzen auf. Die Irrtumswahrscheinlichkeit, daß eine Aufspaltung im Verhältnis von 1:3 (bzw. 1:1) vorliegt, ist mit $P < 1\%$ sehr gering. Folglich komplementieren sich die heterozygoten (bzw. rezessiven) Genotypen nach Kreuzung in ihren Nachkommenschaften zum fertilen Wildtyp, und es handelt sich bei der *st2*-Sterilität nicht um einen allelischen Zustand von einem der beiden anderen Gene, sondern um ein von *wi* und *st1* verschiedenes drittes Gen.

4.3.3 Analyse der für die Einlagerung der kerngenetischen Sterilitätsfaktoren verwendeten Mutterpflanzen

Neben der Feststellung des Cytoplasmatyps (Kapitel 3) sollten die in den Kreuzungen verwendeten maternalen Eltern bezüglich ihrer Konstitution am Restorerlocus *X/x*, am Temperatur-sensitiven Restorerlocus *T/t* sowie bezüglich eventuell weiterer vorliegender rezessiver Sterilitätsgene definiert werden. Dazu wurden diese Pflanzen geselbstet und als paternaler Elter mit Temperatur-insensitiven CMS-Pflanzen (*S*)*xxtt* gekreuzt. Die Ergebnisse der Bonitur der Nachkommenschaften bei normalen Temperaturen (20°/12°C, Tag/Nacht) und hohen Temperaturen (konstant 24°C) sind in den Tabellen 4.3 – 4.5 dargestellt. Die Boniturnwerte der Einzelpflanzen sind im Anhang (Tabelle 11.3 – 11.5) aufgeführt.

Tab. 4.3: Analyse der Pflanze Gr.9, die bei den Einlagerungen der kerngenetischen Sterilitätsfaktoren in den Cytoplasmatyp (1) als maternaler Elter verwendet wurde

Selbstung von Gr.9			Bestäubung von (S) <i>xxtt</i> (6025/35) durch Gr.9		
Nachkommenschaft: 14007	Bonitur bei den Temperaturstufen 20°/12°C 24°/24°C		Nachkommenschaft: 14014	Bonitur bei den Temperaturstufen 20°/12°C 24°/24°C	
Summe der Pflanzen: steril : fertil	0 : 35	-	Summe der Pflanzen: steril : fertil	10 : 10	6 : 7
Temperaturreaktion: Temp- : Temp+	-		Temperaturreaktion: Temp- : Temp+	6 : 0	

Temp- = Temperatur-insensitiv

Temp+ = Temperatur-sensitiv

Nach Selbstung der Pflanze Gr.9 traten in der Nachkommenschaft unter 35 Pflanzen keine sterilen auf, so daß keine Hinweise vorliegen, daß Sterilitätsallele vorhanden sind, die in diesem Cytoplasmatyp (1) ausgeprägt werden. Die Kreuzung mit dem Genotyp (S)*xxtt* ergab dagegen bei normalen Temperaturen eine Aufspaltung 10 steriler und 10 restorierter Pflanzen, also ein Spaltungsverhältnis von 1:1. Folglich ist die Pflanze Gr.9 am Restorerlocus *X/x* heterozygot. Dies bestätigt frühere Untersuchungen von TATLIOGLU (1982). Das bei Gr.9 vorliegende Cytoplasma (1) ist demnach ein Maintainercytoplasma für die CMS, da in der Selbstungsnachkommenschaft 1/4 der Pflanzen am Restorerlocus rezessiv sein müssen, die Sterilität aber nicht ausgeprägt wird.

Bei hohen Temperaturen reagierte keine der 6 untersuchten sterilen Pflanzen der Kreuzungsnachkommenschaft mit einer Förderung der Fertilität. Mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $P = 1,6\%$ kann damit eine 1:1-Aufspaltung Temperatur-insensitiver und -sensitiver Pflanzen ausgeschlossen werden. Gr.9 trägt folglich das Temperatur-sensitive Restorerger *T/t* in rezessiver Konstitution und hat demnach den Genotyp (1)*Xxtt*.

Tab. 4.4: Analyse der Pflanze 2035/1, die bei den Einlagerungen der kerngenetischen Sterilitätsfaktoren in den Cytoplasmatyp (3) als maternaler Elter verwendet wurde

Selbstung von 2035/1			Bestäubung von (S) <i>xxtt</i> (6025/35) durch 2035/1		
Nachkommenschaft: 14004	Bonitur bei den Temperaturstufen 20°/12°C 24°/24°C		Nachkommenschaft: 14013	Bonitur bei den Temperaturstufen 20°/12°C 24°/24°C	
Summe der Pflanzen: steril : fertil	0 : 6	-	Summe der Pflanzen: steril : fertil	35 : 0	33 : 0
Temperaturreaktion: Temp- : Temp+	-		Temperaturreaktion: Temp- : Temp+	33 : 0	

Temp- = Temperatur-insensitiv

Temp+ = Temperatur-sensitiv

Da nach Selbstung der Pflanze 2035/1 nur 6 Pflanzen der Nachkommenschaft bonitiert wurden, ist die Irrtumswahrscheinlichkeit für den Ausschluß einer 1:3-Aufspaltung mit 17,8% sehr hoch. In früheren Untersuchungen waren jedoch nach Selbstung der Pflanze 2035/1 ebenfalls nur fertile Pflanzen bonitiert worden (TATLIOGLU 1982), so daß kein Hinweis auf ein rezessives Sterilitätsgen, daß in dem Cytoplasmatyp (3) Sterilität bedingen kann, vorliegt.

Nach Kreuzung mit dem Genotyp (S)*xxtt* bestand die Nachkommenschaft dagegen aus 35 sterilen Pflanzen. 2035/1 ist folglich ein Maintainer für die CMS und hat somit eine rezessive Konstitution am Restorerlocus *X/x*. Dies bestätigt frühere Untersuchungen von TATLIOGLU (1982). Da bei hohen Temperaturen von 33 untersuchten sterilen Pflanzen keine mit einer Förderung der Fertilität reagierte, liegt das Temperatur-sensitive Restorer-gen *T/t* bei 2035/1 in rezessiver Form vor, und folglich besitzt 2035/1 die genetische Konstitution (3)*xxtt*.

Tab. 4.5: Analyse der bei den Einlagerungen als Cytoplasmatyp (5) verwendeten Pflanze 2023/14

Selbstung von 2023/14			Bestäubung von (S) <i>xxtt</i> (6025/35) durch 2023/14		
Nachkommenschaft: 14006	Bonitur bei den Temperaturstufen		Nachkommenschaft: 14016	Bonitur bei den Temperaturstufen	
	20°/12°C	24°/24°C		20°/12°C	24°/24°C
Summe der Pflanzen: steril : fertil	14 : 51	7:46	Summe der Pflanzen: steril : fertil	17 : 13	13 : 16
Temperaturreaktion: Temp- : Temp+	7 : 7		Temperaturreaktion: Temp-: Temp+	13 : 4	

Temp- = Temperatur-insensitiv

Temp+ = Temperatur-sensitiv

Nach Selbstung der Pflanze 2023/14 erfolgte bei Temperaturen von 20/12°C (Tag/Nacht) eine Aufspaltung steriler und fertiler Pflanzen im Verhältnis 14:51. Dies entspricht einer 1:3-Spaltung (χ^2 -Wert: 0,25) und kann durch die Annahme eines rezessiv vererbten kerngenetischen Sterilitätsfaktors erklärt werden, der bei 2023/14 in heterozygoter Konstitution vorliegt. Eine Aufspaltung steriler und fertiler Pflanzen in einer Selbstungsnachkommenschaft dieser Pflanze war schon früher beobachtet worden (TATLIOGLU 1982). Die damals vorliegenden Spaltungsverhältnisse nach Selbstung (1:3) und Kreuzung mit einem cytoplasmatisch männlich sterilen Genotyp (1:1) wurden damit interpretiert, daß bei 2023/14 das (S)-Cytoplasma und als kerngenetischer Sterilitätsfaktor das Restorer-gen *X/x* in heterozygoter Konstitution vorliegt. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Kreuzung mit der CMS-Pflanze 6025/38 ergab eine Aufspaltung von 17 sterilen zu 13 fertilen Pflanzen. Auch dieses Verhältnis ist nicht signifikant von einem 1:1-Verhältnis verschieden (χ^2 -Wert: 0,3), das unter der Annahme der heterozygoten Konstitution am *X/x*-Locus bei der Pflanze 2023/14 in der Kreuzungsnachkommenschaft zu erwarten ist.

Nach den Ergebnissen aus Kapitel 3 der vorliegenden Arbeit ist jedoch die mitochondriale Genomorganisation der Pflanze 2023/14 von der des (S)-Cytoplasmas verschieden. In einer weiteren Kreuzung wurde die Pflanze 2023/14 nach Kastration mit dem Maintainer 2035/1 bestäubt. Die resultierende Nachkommenschaft (14010) bestand aus 13 fertilen Pflanzen, sterile traten nicht auf. Würde bei 2023/14 der Genotyp (S)*Xx* vorliegen, hätte diese Kreuzung eine 1:1-Aufspaltung ergeben müssen. Somit ist der Beweis erbracht, daß 2023/14 und damit das Cytoplasma (5) die CMS-Sequenz des (S=4)-Cytoplasmas nicht enthalten kann. Der Phänotyp der sterilen Pflanzen in der Selbstungsnachkommenschaft von 2023/14 läßt sich von dem CMS-Phänotyp unterscheiden (vergl. Abb. 4.2 mit Abb. 2.2b), zeigt jedoch eine Variation von bräunlich verkümmerten Antheren bis hin zu den in der Abbildung gezeigten verdickten gelben Antheren.

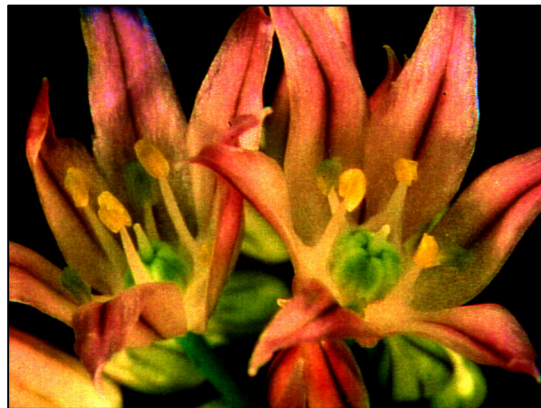


Abb. 4.2: Phänotyp der in der Selbstungsnachkommenschaft von 2023/14 aufgetretenen Sterilität

In der Selbstungsnachkommenschaft von 2023/14 spaltet demnach eine neue Sterilität auf, die durch hohe Temperaturen beeinflusst werden kann. Die gefundenen Aufspaltungen bezüglich der Temperaturreaktion lassen sich nur bedingt durch das dominante *T*-Gen erklären. Würde dieses bei 2023/14 dominant vorliegen und könnte auch die neue Sterilität beeinflussen, wäre in der Selbstungsnachkommenschaft ein 0:1-Verhältnis (insensitiv : sensitiv) zu erwarten, würde es heterozygot vorliegen, ergebe sich ein 1:3- und bei rezessiver Konstitution ein 1:0-Verhältnis. Das gefundene Verhältnis von 7 Temperatursensitiven zu 7 -insensitiven Pflanzen ergibt für die Annahme einer 1:3-Spaltung einen χ^2 -Wert von 3,43. Dieser führt bei $\alpha = 0,05$ zwar noch nicht zur Ablehnung des 1:3-Verhältnisses (kritischer Wert = 3,84), ist aber vor dem Hintergrund der kleinen Stichprobengröße kritisch zu betrachten. In der Kreuzungsnachkommenschaft (S)*xxtt* x 2023/14 wäre dann eine 1:1-Aufspaltung insensitiver und sensitiver Pflanzen zu erwarten. Das Spaltungsergebnis mit 13 insensitiven zu 4 sensitiven Pflanzen ergibt einen χ^2 -Wert von 3,76. Ein alternatives Modell, daß durch kleinere χ^2 -Werte die Vererbung der neuen Sterilität und ihrer Temperatursensitivität in der Selbstungs- und Kreuzungsnachkommenschaft besser erklären kann, wird in Kapitel 4.4.4 diskutiert.

4.3.4 Analyse des kerngenetischen Sterilitätsfaktors *wi* nach Einlagerung in die Cytoplasmen (3) und (5)

In Kapitel 3 der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß die *wi*-Sterilität in den Cytoplasmen (1) und (2) ausgeprägt wird. In der nachfolgenden Tabelle 4.6 sind die Spaltungsergebnisse nach Einlagerung des *wi*-Gens in die Cytoplasmen (3) und (5) aufgeführt.

Tab. 4.6: Spaltungsergebnisse nach Einlagerung des *wi*-Gens in die Cytoplasmen (3) und (5)

Einlagerung des <i>wi</i> -Gens aus dem Cytoplasma (1)	Aufspaltung in den Einzel- nachkommenschaften:		Summen: Zahl der		
	sterile Pflanzen	fertile Pflanzen	Nachkommen- schaften	sterilen Pflanzen	fertilen Pflanzen
in das Cytoplasma (3) P: 2035/1 x 8015/65 F ₁ : 14001	0	23			
F ₂ : nicht spaltende: 15066	0	21			
15067	0	34	2	0	55
spaltende: 15069	3	9			
15070	4	17			
15071	2	10			
15072	4	12			
15073	6	17	5	19	65
in das Cytoplasma (5) P: 2023/14 x 8015/65 F ₁ : 13006	0	30			
F ₂ : nicht spaltende: 15006	0	6	1 ^a	0	6
spaltende: 15001	3	8			
15002	1	7			
15004	7	10			
15005	3	10	4	14	35

^a = nicht statistisch abgesichert, Erklärung im Text.

Bei der Einlagerung in das Cytoplasma (3) wurden in der F₁ ausschließlich fertile Pflanzen bonitiert. Dies entspricht der Erwartung nach dem Kreuzungsmodell aus Abbildung 4.1. Nach diesem Modell wird in der F₂ bei der Hälfte der Nachkommenschaften eine Aufspaltung im Verhältnis 1:3 (steril zu fertil) erwartet, wenn das *wi*-Gen genische männliche Sterilität bedingt. Die Aufspaltung steriler und fertiler Pflanzen in der Summe der spaltenden Nachkommenschaften entspricht mit 19:65 dem erwarteten 1:3- Verhältnis (χ^2 -Wert: 0,14).

Bei der Einlagerung in das Cytoplasma (5) ist zu berücksichtigen, daß hier nach den Untersuchungen aus Kapitel 4.3.3 neben dem *wi*-Gen die Aufspaltung eines zweiten rezessiv vererbten Gens zu erwarten ist. Dies liegt bei der Mutterpflanze (2023/14) in heterozygoter Form vor. Nach Kreuzung mit der bezüglich des *wi*-Gens heterozygoten Pflanze findet in der F₁ eine Komplementation zur Fertilität statt (Spaltungsverhältnis 0:30), so daß das Sterilitätsgen der Pflanze 2023/14 nicht ein allelischer Zustand des *wi*-Gens sein kann, sondern bei dem anderen Elter der Kreuzung (8015/65) dominant vorliegen muß. Die F₁

besteht demnach zu 1/4 aus Pflanzen, bei denen beide Sterilitätsgene in homozygot dominanter Konstitution vorliegen, zu jeweils 1/4 aus Pflanzen, bei denen entweder das eine oder das andere Sterilitätsgen heterozygot vorliegt und zu 1/4 aus Pflanzen, die beide Gene in heterozygoter Form tragen. Folglich besteht 1/4 der Nachkommenschaften in der F_2 nur aus fertilen Pflanzen, in 1/4 spaltet eine Sterilität, in 1/4 die andere Sterilität und in 1/4 beide Sterilitäten. Es ist demnach ein Verhältnis von einer nicht spaltenden zu drei spaltenden Nachkommenschaften zu erwarten, von denen zwei im Verhältnis von 1:3 (sterile Pflanzen zu fertile) aufspalten müßten, während in der Nachkommenschaft der doppelt heterozygoten F_1 -Pflanze eine 7:9-Spaltung zu erwarten ist. Bei der Linie 15006 kann aufgrund der zu kleinen Nachkommenschaftsgröße (6 fertile Pflanzen) nicht entschieden werden, ob tatsächlich eine nicht spaltende Nachkommenschaft vorliegt. Wird dies angenommen (Irrtumswahrscheinlichkeit $P = 17,8\%$), so liegt ein Verhältnis von einer nicht spaltenden zu vier spaltenden Nachkommenschaften vor. Dies entspricht dem erwarteten 1:3-Verhältnis. Werden die Verhältnisse steriler und fertiler Pflanzen innerhalb der spaltenden Nachkommenschaften betrachtet, so können die Linien 15001, 15002 und 15005 als solche interpretiert werden, bei denen nur jeweils eine Sterilität im Verhältnis 1:3 spaltet. Das gefundene Verhältnis von 7 sterilen zu 10 fertilen Pflanzen in der Linie 15004 ist eher als eine 7:9-Spaltung zu interpretieren, die zu erwarten ist, wenn beide Gene spalten. Allerdings weicht das gefundene Verhältnis auch nicht signifikant von einem 1:3-Verhältnis ab (χ^2 -Wert: 2,08), so daß nicht ausgeschlossen werden kann, daß in der Linie 15004 nur eins der beiden Sterilitätsgene spaltet.

Da einige sterile Pflanzen aufgrund ihres Phänotyps eindeutig der *wi*-Sterilität zugeordnet werden konnten, ist sichergestellt, daß dieser kerngenetische Sterilitätsfaktor auch in dem Cytoplasma (5) ausgeprägt wird.

4.3.5 Analyse des kerngenetischen Sterilitätsfaktors *st1* nach Einlagerung in die Cytoplasmen (1), (3) und (5)

Der kerngenetische Sterilitätsfaktor *st1* ist in dem Cytoplasmatyp (2) aufgetreten (vgl. Kapitel 3) und wurde in die Cytoplasmen (1), (3) und (5) eingelagert. Die dabei aufgetretenen Aufspaltungen sind in der Tabelle 4.7 zusammengefaßt:

Tab. 4.7: Spaltungsergebnisse nach Einlagerung des *st1*-Gens in die Cytoplasmen (1), (3) und (5)

Einlagerung des <i>st1</i> -Gens aus dem Cytoplasma (2)	Aufspaltung in den Einzelnachkommenschaften:		Summen: Zahl der		
	sterile Pflanzen	fertile Pflanzen	Nachkommenschaften	sterilen Pflanzen	fertilen Pflanzen
in das Cytoplasma (1) P: Gr.9 x 9002/4 F ₁ : 13012	0	29			
F ₂ : nicht spaltende: 15021	(1)	19			
15023	0	20			
15024	0	15			
15026	0	32			
15027	(1)	17	5	(2)	103
spaltende: 15020	11	34			
15022	3	5			
15025	1	4	3	15	43
in das Cytoplasma (3) P: 2035/1 x 9001/11 F ₁ : 14002	0	33			
F ₂ : nicht spaltende: 15081	0	16			
15082	0	25			
15083	0	31			
15084	(1)	16			
15087	0	15			
15088	0	21			
15089	(1)	20	7	(2)	144
spaltende: 15075	3	19			
15076	2	7			
15078	10	21			
15079	5	13			
15080	8	22			
15085	4	27	6	32	109
in das Cytoplasma (5) P: 2023/14 x 9001/11 F ₁ : 13013	0	25			
F ₂ : nicht spaltende: 15031	0	12			
15033	0	26	2	0	38
spaltende: 15028	3	27			
15029	2	10			
15030	4	16			
15032	19	13			
15034	7	13			
15035	5	19			
15036	6	7			
15037	5	28	8	51	133

Die nach Einlagerung in die Cytoplasmen (1) und (3) aufgetretenen Verhältnisse spaltender und nicht spaltender Nachkommenschaften (erwartet: 1:1), und auch die Spaltungen steriler und fertiler Pflanzen (erwartet: 1:3) weichen nicht signifikant von den Erwartungswerten ab, die sich aufgrund des Kreuzungsmodells (Abbildung 4.1) ergeben. Die *st1*-Sterilität wird folglich auch in diesen Cytoplasmen ausgeprägt. Bei Einlagerung

des *stl*-Gens in das Cytoplasma (5) muß wiederum berücksichtigt werden, daß bei dem maternalen Elter 2023/14 ein kerngenetischer Sterilitätsfaktor in heterozygoter Konstitution vorliegt. Es ergibt sich die gleiche Situation wie bei der Einlagerung der *wi*-Sterilität in dieses Cytoplasma. Auch hier erfolgt in der F_1 die Komplementation, so daß der kerngenetische Sterilitätsfaktor der Pflanze 2023/14 nicht eine allelische Form des *stl*-Gens sein kann. Das gefundene Verhältnis von zwei nicht spaltenden zu acht spaltenden Nachkommenschaften in der F_2 (erwartet: 1:3, vergl. 4.3.4), und auch die Aufspaltungen steriler und fertiler Pflanzen innerhalb der spaltenden Nachkommenschaften, lassen sich mit der freien Spaltung zweier rezessiv vererbter Sterilitätsfaktoren erklären. Dabei weicht das in der Linie 15032 aufgetretene Verhältnis von 19 sterilen zu 13 fertilen Pflanzen von einem 1:3-Verhältnis signifikant ab (χ^2 -Wert: 18,37). Bei Annahme zweier spaltender Gene und dem daraus resultierenden 7:9-Verhältnis, kann die gefundene Aufspaltung in dieser Linie jedoch erklärt werden (χ^2 -Wert: 2,57). Auch die Aufspaltung von 6 sterilen und 7 fertilen Pflanzen in der Linie 15036 ist eher an ein 7:9 als an ein 1:3-Verhältnis angepaßt, auch wenn hier keine signifikante Abweichung von letzterem vorliegt (χ^2 -Wert: 2,08). Die übrigen 6 spaltenden Nachkommenschaften zeigen ebenfalls keine signifikanten Abweichungen von einem 1:3-Verhältnis. In diesen spaltet demnach jeweils nur eines der beiden Gene. Diese Ergebnisse zeigen, daß die *stl*-Sterilität auch in dem Cytoplasmatyp (5) ausgeprägt werden kann.

Auffällig ist das Auftreten jeweils einer sterilen Pflanze in den als nicht spaltende Nachkommenschaften eingestuften Linien 15021, 15027, 15084 und 15089 nach Einlagerung in das Cytoplasma (1) und (3). Bei einer gleichsinnigen monarchialen Wirkung zweier Gene, daß heißt jedes Gen kann das andere in der Weise vertreten, daß der Wildtyp ausgebildet wird (volle Wirkung jedes einzelnen Gens), ergibt sich nach Selbstung einer doppelt heterozygoten Pflanze ein Spaltungsverhältnis von einer Mutante zu fünfzehn Wildtypen. Wird in den angesprochenen Linien eine solche Aufspaltung von 1:15 angenommen, so liegt eine neue Sterilität vor, die nur dann ausgeprägt wird, wenn gleichzeitig zwei Gene in rezessiver Konstitution vorhanden sind. Da nach Selbstung der Mutterpflanzen entsprechende Spaltungsverhältnisse nicht auftraten, ist anzunehmen, daß bei den Pflanzen Gr.9 und 2035/1 nur jeweils eins der beiden Gene heterozygot vorliegt. Die als paternale Eltern verwendeten Pflanzen 9001/11 und 9002/4 müßten dann mindestens das jeweils andere Gen in heterozygoter Konstitution tragen. Die F_1 wäre folglich fertil, in der F_2 würden 1/4 der Nachkommenschaften im Verhältnis 1:15 aufspalten. Der Anteil der im Verhältnis von 1:15 spaltenden Linien an der Gesamtzahl der Linien der F_2 zeigt mit 2:11 (bei 2035/1) und 2:6 (bei Gr.9) keine signifikante Abweichung von dem erwarteten 1:4-Verhältnis. Allerdings kann aufgrund der Stichprobengröße bei den als nicht spaltende Linien interpretierten Nachkommenschaften nicht ausgeschlossen werden, daß noch weitere von diesen tatsächlich eine 1:15-Spaltung aufweisen. Das gleiche gilt zum Teil auch für die 1:3-spaltenden Linien. Folglich ist es möglich, daß bei einigen Pflanzen, die

der *stl*-Sterilität zugeordnet wurden, die Sterilität durch das Zusammenwirken der beiden neuen Gene in ihrer rezessiver Form bedingt wird.

Zur Überprüfung der Hypothese, daß in den beiden durchgeführten Kreuzungen (Gr.9 x 9002/4 und 2035/1 x 9001/11) tatsächlich zwei zusätzliche Sterilitätsgene mitgeführt wurden, und keine spontanen Mutationen aufgetreten sind, wurde der maternale Elter der einen Kreuzung (Gr.9) nach Kastration mit dem maternalen Elter der anderen Kreuzung bestäubt. Tragen beide Pflanzen jeweils eins der neuen Sterilitätsgene in heterozygoter Konstitution, so sind in der F₁ nur fertile Pflanzen und in der F₂ bei 1/4 der Nachkommenschaften sterile Pflanzen im Verhältnis 1:15 zu erwarten. Die beobachteten Aufspaltungen sind in der Tabelle 4.8 zusammengefaßt.

Tab. 4.8: Spaltungsergebnisse nach Kreuzung von Gr.9 und 2035/1 zur Verifizierung zweier gleichsinnig monarchial wirkender Sterilitätsgene

P: Gr.9 x 2035/1	Aufspaltung in den Einzel-		Summen: Zahl der		
	sterile Pflanzen	fertile Pflanzen	Nachkommen- schaften	sterilen Pflanzen	fertilen Pflanzen
F ₁ : 14011, 14012	0	53			
F ₂ : nicht spaltende:					
15097	0	22			
15099	0	25			
15101	0	25			
15102	0	27			
15103	0	18			
15105	0	19			
15107	0	26			
15108	0	30			
15109	0	21			
15110	0	13			
15111	0	20			
15112	0	17			
15113	0	20	13	0	283
spaltende:					
15098	3	15			
15100	3	15			
15104	1	13			
15106	1	28	4	8	71

Das gefundene Verhältnis von 4 spaltenden zu 13 nicht spaltenden Nachkommenschaften in der F₂ weicht nicht signifikant von dem erwarteten 1:3-Verhältnis ab. Allerdings ist die Zahl bonitierter Pflanzen in den als nicht spaltende Nachkommenschaften eingestuft Linien zu gering, um die Ablehnung einer 1:15-Aufspaltung steriler und fertiler Pflanzen statistisch absichern zu können. Innerhalb der spaltenden Nachkommenschaften weicht das Verhältnis der Summe steriler Pflanzen zur Summe fertiler Pflanzen mit 8:71 nicht signifikant von dem erwarteten 1:15-Verhältnis ab (χ^2 -Wert: 1,42). Alle aufgetretenen Spaltungsergebnisse weisen also darauf hin, daß die sterilen Pflanzen durch die gleichsinnige monarchiale Wirkung zweier rezessiver Gene bedingt werden. Diese Gene werden mit *M/m* und *N/n* bezeichnet.

4.3.6 Analyse des kerngenetischen Sterilitätsfaktors *st2* nach Einlagerung in das Cytoplasma (1)

Der kerngenetische Sterilitätsfaktor *st2* ist in dem Cytoplasmatyp (5) aufgetreten (vgl. Kapitel 3) und wurde in das Cytoplasma (1) eingelagert. Die dabei aufgetretenen Aufspaltungen sind in der Tabelle 4.9 zusammengefaßt:

Tab. 4.9: Spaltungsergebnisse nach Einlagerung des *st2*-Gens in das Cytoplasma (1)

Einlagerung des <i>st2</i> -Gens aus dem Cytoplasma (5)	Aufspaltung in den Einzelnachkommenschaften:		Summen: Zahl der		
	sterile Pflanzen	fertile Pflanzen	Nachkommenschaften	sterilen Pflanzen	fertilen Pflanzen
in das Cytoplasma (1)					
P: Gr. 9 x 9046/6					
F ₁ : 13022, 13023	0	45			
F ₂ : nicht spaltende: 15038	0	11			
15039	0	20			
15040	0	17			
15041	0	35			
15043	0	29			
15044	0	31			
15045	0	15			
15047	0	17			
15048	(1)	29			
15049	(1)	25			
15050	0	32			
15051	0	18			
15052	0	16			
15053	0	14			
15054	0	24			
15055	0	11	16	(2)	389
spaltende:	-	-	0	-	-

Zur Einlagerung des kerngenetischen Sterilitätsfaktors *st2* in das Cytoplasma (1) wurden zwei unabhängige Kreuzungen durchgeführt. In der F₁ (Linien 13022 und 13023) wurden ausschließlich fertile Pflanzen bonitiert. Die F₂ bestand aus 16 Nachkommenschaften, bei denen eine Aufspaltung im Verhältnis 1:3 ausgeschlossen werden kann (Irrtumswahrscheinlichkeiten der Einzelnachkommenschaften je nach Stichprobengröße P = 0,00% - 4,2%). In den Linien 15048 und 15049 trat jeweils eine sterile Pflanze auf, deren Phänotypen aber nicht dem *st2*-Phänotyp entsprachen. Diese sterilen Pflanzen sind folglich bezüglich der Spaltungsverhältnisse des *st2*-Gens nicht zu berücksichtigen, zumal die Verhältnisse zu den fertilen Pflanzen in diesen Nachkommenschaften signifikant von einem 1:3-Verhältnis abweichen (χ^2 -Wert für die Linie 15048: 5,13; für die Linie 15049: 6,4). In der Kreuzung der Parentalgeneration wurde Gr.9 verwendet und als paternaler Elter 9046/6. Letztere Pflanze ist aus einer Kreuzung mit 2035/4 hervorgegangen, die der gleichen Inzuchtlinie wie 2035/1 entnommen wurde. Folglich ist anzunehmen, daß die Sterilität der beiden Pflanzen in den hier betrachteten F₂-Linien durch die gleichsinnig

monarchiale Wirkung der Gene M/m und N/n in ihrer rezessiven Form bedingt wird, und ein 1:15-Verhältnis vorliegt (vergl. 4.3.5).

Mit 16 bezüglich des $st2$ -Gens nicht spaltenden Nachkommenschaften kann mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $P = 0,00\%$ ausgeschlossen werden, daß eine Aufspaltung der Nachkommenschaften in spaltende und nicht spaltende im Verhältnis 1:1 vorliegt (vergl. Kreuzungsmodell in Abbildung 4.1). Die Spaltungsanalysen zeigen somit, daß die $st2$ -Sterilität in dem Cytoplasma (1) nicht ausgeprägt werden kann, und folglich ein cytoplasmatischer Erbfaktor des ursprünglichen Cytoplasmas (5) an der Ausprägung dieser Sterilität beteiligt sein muß. In diesem Falle ist der kerngenetische Sterilitätsfaktor $St2/st2$ ein dominantes Restorerogen dieser CMS, und Pflanzen der genetischen Konstitution $(1)st2st2$, die in der Hälfte der F_2 -Linien im Verhältnis 1:3 vorhanden sein müssen, sind Maintainer. Der cytoplasmatische Erbfaktor des Cytoplasmas (5) wurde in einer reziproken Kreuzung bestätigt. Die dabei aufgetretenen Spaltungsverhältnisse sind in der Tabelle 4.10 gezeigt.

Tab. 4.10: Spaltungsanalysen einer reziproken Kreuzung zur Verifizierung eines cytoplasmatischen Erbfaktors:

Kreuzungstyp mit den Pflanzen	(5) $St2st2$ 9046/6 als maternaler Elter verwendet	X	(1) $st2st2$ 13022/1 als maternaler Elter verwendet
	↓		↓
F_1 -Linie:	16002		16001
Spaltung steril : fertil	11 : 7		0 : 28

Die zu erwartende 1:1 Aufspaltung steriler und fertiler Pflanzen wurde nur bei der Nachkommenschaft beobachtet, deren maternaler Elter das Cytoplasma (5) trägt, so daß tatsächlich ein Erbfaktor dieses Cytoplasmas an der Ausprägung der Sterilität beteiligt sein muß.

Durch Bestäubung steriler Genotypen mit Pflanzen aus den oben angesprochenen F_2 -Linien (Tabelle 4.9) konnten Maintainer selektiert und damit verifiziert werden, daß tatsächlich ein neues CMS-System vorliegt. Bei 18 durchgeführten Kreuzungen wurden 8 Nachkommenschaften erzeugt, die ausschließlich aus sterilen Pflanzen bestehen. Es sind demnach mehr Maintainer in der F_2 vorhanden, als nach dem Kreuzungsmodell zu erwarten war (Erwartungswert = 1/8). Dies weist darauf hin, daß der maternale Elter der Kreuzung entgegen der Annahme im Kreuzungsmodell nicht homozygot dominant bezüglich des $St2/st2$ -Gens ist. Liegt das $St2/st2$ -Gen bei Gr.9 in heterozygoter Form vor, erhöht sich der Erwartungswert für die Maintainer in der F_2 auf 3/8, bei 18 Nachkommenschaften also auf 6,5. Damit läßt sich die gefundene Zahl von 8 Maintainern erklären.

Tab. 4.11: Maintainerselektion für die neue CMS

Kreuzungstyp: (5) <i>st2st2</i> x (1) <i>st2st2</i>		F ₁ -Linie	Aufspaltung steril : fertil	
10040/45	15038/3	16017	9	0
	15038/11	16018	10	0
	15040/1	16019	8	0
	15045/10	16021	7	0
	15049/4	16026	12	0
	15049/13	16027	17	0
	15050/3	16028	26	0
10040/38	15049/15	16033	29	0

In der nebenstehenden Tabelle 4.11 sind die selektierten Maintainer mit Angabe der Aufspaltung in der F₁ nach Kreuzung mit einer sterilen Pflanze aufgeführt.

4.4 Diskussion

4.4.1 Der methodische Ansatz

Nach Klärung der Vererbung der kerngenetischen Sterilitätsfaktoren *wi*, *st1* und *st2* und Durchführung von Komplementationstests zur Bestätigung, daß tatsächlich drei verschiedene Gene und nicht Allele eines Gens vorliegen, wurden diese Gene zur Unterscheidung von CMS und GMS in verschiedene Cytoplasmen eingelagert. In der Vergangenheit wurden solche klassisch genetischen Analysen mit Pflanzen verschiedener Akzessionen durchgeführt, in der Hoffnung, daß diese Akzessionen verschiedene Cytoplasmen enthalten. Die Erkenntnis, daß Umorganisationen im mitochondrialen Genom die Voraussetzung für die Entstehung von Sterilitäts- und Normalcytoplasmen sind, wurden in der vorliegenden Arbeit genutzt, um eine gezielte Einlagerung der kerngenetischen Sterilitätsfaktoren zu ermöglichen. Durch die vorangegangene molekulargenetische Unterscheidung der Cytoplasmatypen (vergl. Kapitel 3) konnte die klassisch genetische Analyse sehr effizient gestaltet werden.

4.4.2 Nachweis der genischen männlichen Sterilitätsform (GMS) bei *Wi/wi* und *St1/st1*

Bei der *wi*-Sterilität waren bereits vor Beginn der vorliegenden Arbeit Kreuzungen durchgeführt worden, bei denen die Einlagerung aus dem Cytoplasma (1) in das Cytoplasma (2) erfolgt war. Dies wurde durch die in Kapitel 3 beschriebenen Untersuchungen nachgewiesen. Nach Einlagerung in die Cytoplasmen (3) und (5) im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß die *wi*-Sterilität in allen vier untersuchten Cytoplasmatypen ausgeprägt wird. Da es äußerst unwahrscheinlich ist, daß diese vier Cytoplasmen einen gemeinsamen cytoplasmatischen Erbfaktor besitzen, der für die Ausprägung der Sterilität notwendig ist, kann angenommen werden, daß die Sterilität

ausschließlich durch das Kerngen *Wi/wi* in rezessiver Form bedingt wird. Folglich liegt entgegen früherer Annahmen von RAUBER et al. (1993) eine genische männliche Sterilität vor. In analoger Weise wurde der Nachweis der GMS für die *st1*-Sterilität geführt, indem die Ausprägung der Sterilität neben dem Ursprungscytoplasma (2) auch in den Cytoplasmen (1), (3) und (5) festgestellt wurde. Damit liegen zwei gut definierte GMS-Formen vor, die weitere molekulare Untersuchungen und einen molekularen Vergleich der Sterilitätssysteme GMS und CMS in einer Pflanzenart ermöglichen. Die Nutzungsmöglichkeiten von GMS-Systemen in der praktischen Pflanzenzüchtung werden in Kapitel 5 diskutiert.

4.4.3 Nachweis einer neuen CMS: (5) *st2 st2*

Nach Einlagerung des kerngenetischen Sterilitätsfaktors *st2* aus dem Cytoplasma (5) in das Cytoplasma (1) wurde ein cytoplasmatischer Erbfaktor nachgewiesen, der zur Ausprägung der Sterilität notwendig ist. Dieser ist in dem Cytoplasmatyp (1) nicht enthalten, und folglich konnten in diesem Cytoplasmatyp Maintainer selektiert werden. Es wurde somit ein neues CMS-System mit Sterilitäts- und Maintainercytoplasma etabliert, bei dem der kerngenetische Sterilitätsfaktor *St2/st2* in dominanter Form die Restoration im Sterilitätscytoplasma bedingt. Die Bedeutung des Nachweises eines zweiten CMS-Systems wird in Kapitel 5 diskutiert.

4.4.4 Nachweis einer neuen rezessiv vererbten Sterilität mit Temperaturreaktion

In der Selbstungsnachkommenschaft von 2023/14 erfolgte bei normalen Temperaturen (20°/12°C) eine Aufspaltung von 14 sterilen und 51 fertilen Pflanzen (Tabelle 4.5). Dies entspricht einer 1:3-Spaltung, und folglich kann die Sterilität durch ein rezessiv vererbtes Gen erklärt werden. Entgegen früheren Annahmen von TATLIOGLU (1982) liegt hier aber nicht die bekannte CMS vor. Nach Kreuzung mit dem Maintainer 2035/1 bestand die resultierende Nachkommenschaft (14010) aus 13 fertilen Pflanzen, sterile traten nicht auf. Würde 2023/14 die genetische Konstitution (S)Xx besitzen, hätte diese Kreuzung eine 1:1-Aufspaltung ergeben müssen. Somit ist der Beweis erbracht, daß 2023/14 nicht die CMS-Sequenz des S-Cytoplasmas enthalten kann. In Kapitel 3 war bereits nachgewiesen worden, daß bei 2023/14 eine andere mitochondriale Genomorganisation, Cytoplasmatyp (5), vorliegt, als bei dem mit (4) bezeichneten (S)-Cytoplasma. Folglich kann die Aufspaltung in der Selbstungsnachkommenschaft von 2023/14 nur durch einen neuen rezessiv vererbten Sterilitätsfaktor erklärt werden, der im folgenden mit *B/b* bezeichnet wird.

Aufgrund der durchgeführten Analysen bezüglich der Einlagerung der Kerngene *wi* und *st1* in das Cytoplasma (5), bei denen 2023/14 als maternaler Elter eingesetzt wurde, ist das *b*-Gen kein allelischer Zustand des *wi*- oder *st1*-Gens, da in der F₁ die Komplementation

zum fertilen Wildtyp erfolgte, und die Spaltungsergebnisse in der F_2 jeweils mit der Annahme zweier unabhängig voneinander spaltender rezessiver Gene erklärt werden konnten (vergl. 4.3.4 und 4.3.5).

Im folgenden wird die Förderung der Fertilität durch hohe Temperaturen bei den sterilen Pflanzen in der Selbstungsnachkommenschaft von 2023/14 und nach Kreuzung eines Genotyps mit der genetischen Konstitution (S)*xxtt* mit 2023/14 diskutiert.

In der Selbstungsnachkommenschaft von 2023/14 reagierte die Hälfte der bei normalen Temperaturen ($20^\circ/12^\circ\text{C}$) sterilen Pflanzen bei Erhöhung der Temperatur auf konstant 24°C mit einer Förderung der Fertilität. Folglich ist die *b*-Sterilität durch hohe Temperaturen in ihrer Ausprägung zu beeinflussen. Das gefundene Spaltungsverhältnis von 7 insensitiven zu 7 sensitiven Pflanzen weicht von einem 1:3-Verhältnis zwar nicht signifikant ab (vergl. 4.3.3), mit der Annahme anderer Spaltungsverhältnisse ergeben sich jedoch kleinere χ^2 -Werte. Im folgenden soll deshalb ein Modell diskutiert werden, bei dem die Beobachtungswerte den theoretisch möglichen Spaltungsverhältnissen besser angepaßt sind. Da in einer Selbstungsnachkommenschaft ein Spaltungsverhältnis von 1:1 nicht auftreten kann, wird ein 7:9-Verhältnis zur Erklärung dieser Reaktion auf die Temperaturveränderung angenommen. Ein solches Spaltungsverhältnis ergibt sich bei Selbstung einer Pflanze, bei der zwei komplementär wirkende Gene in heterozygoter Konstitution vorliegen. Wirken dabei die dominanten Allele in der Weise zusammen, daß sich ihre Effekte ergänzen, und der Wildtyp ausgeprägt wird, ergibt sich ein Verhältnis von 7 Mutanten zu 9 Wildtypen. Wird im vorliegenden Fall die Sensitivität, also die Förderung der Fertilität bei hohen Temperaturen durch die dominanten Allele hervorgerufen, würde in der Nachkommenschaft ein Verhältnis von 7 insensitiven zu 9 sensitiven Pflanzen erwartet. Wird dagegen die Insensitivität durch die dominanten Allele bedingt, würde sich das Spaltungsverhältnis umkehren. Das gefundene Verhältnis (7:7) zeigt keine signifikante Abweichung von einer dieser beiden Hypothesen. Die Temperatur-Sensitivitätsgene der *b*-Sterilität werden im folgenden mit *Y/y* und *Z/z* bezeichnet.

In der Kreuzungsnachkommenschaft des CMS-Genotyps 6025/35 mit 2023/14 weicht die Aufspaltung von 17 sterilen und 13 fertilen Pflanzen (Tabelle 4.5) bei normalen Temperaturen ($20^\circ/12^\circ\text{C}$) nicht signifikant von einem 1:1-Verhältnis ab (χ^2 -Wert: 0,23). Dies könnte durch Annahme der heterozygoten Konstitution am Restorerlocus *X/x* bei 2023/14 erklärt werden und würde der Interpretation früherer Ergebnisse von TATLIOGLU (1982) entsprechen. Wird diese Hypothese einer ausschließlich durch das *X/x*-Gen bedingten Aufspaltung steriler und fertiler Pflanzen im Verhältnis 1:1 angenommen, und weiterhin die Temperaturreaktion der sterilen Pflanzen bei konstant 24°C durch das dominante *T*-Gen der CMS erklärt, ist eine Aufspaltung Temperatur-insensitiver und -sensitiver Pflanzen im Verhältnis 1:1 denkbar. Die Aufspaltung von 13 Temperatur-insensitiven zu 4 -sensitiven Pflanzen zeigt mit einem χ^2 -Wert von 3,76 keine signifikante

Abweichung von diesem Verhältnis. Da der maternale Elter der Kreuzung eine Temperatur-insensitive CMS-Pflanze war, (S)*xxtt*, müßte in diesem Falle das *T/t*-Gen bei dem paternalen Elter (2023/14) in heterozygoter Konstitution vorliegen. Auch hier führt jedoch die Annahme, daß in der Kreuzungsnachkommenschaft des CMS-Genotyps mit 2023/14 Pflanzen auch die *b*-Sterilität aufspaltet, und die Temperaturreaktion durch die komplementäre Wirkung der Gene *Y/y* und *Z/z* bedingt wird, zu einer besseren Anpassung der beobachteten Spaltungsergebnisse an die Erwartungswerte. In diesem Falle würde sich folgendes Kreuzungsschema ergeben (Tabelle 4.12). Die angegebenen Phänotypen sind bei Normaltemperaturen (20°/12°C) zu erwarten.

Tab. 4.12: Modell zur Erklärung der Spaltungsverhältnisse in der Kreuzungsnachkommenschaft 6025/8 x 2023/14

Elter	Gameten	paternal: 2023/14 = (5) <i>Xx Bb</i>			
		<i>XB</i>	<i>Xb</i>	<i>xB</i>	<i>xb</i>
maternal: 6025/8 = (S=4) <i>xx Bb</i>	<i>x B</i>	<i>Xx BB</i> fertil	<i>Xx Bb</i> fertil	<i>xx BB</i> steril (CMS)	<i>xx Bb</i> steril (CMS)
	<i>x b</i>	<i>Xx Bb</i> fertil	<i>Xx bb</i> steril (<i>b</i>)	<i>xx Bb</i> steril (CMS)	<i>xx bb</i> steril (CMS und <i>b</i>)

Wie aus der Tabelle 4.12 ersichtlich ist, ergibt sich eine Aufspaltung steriler und fertiler Pflanzen im Verhältnis 5:3. Die gefundene Aufspaltung (17:13, Tabelle 4.5) bei normalen Temperaturen zeigt eine gute Anpassung an dieses Verhältnis (χ^2 -Wert: 0,22).

Bei Annahme dieser Spaltungsverhältnisse unter normalen Temperaturen lassen sich auch die Temperaturreaktionen der sterilen Pflanzen in dieser Nachkommenschaft erklären. Das Temperatur-sensitive Restorer-gen der CMS, *T/t*, liegt bei dem maternalen Elter der Kreuzung rezessiv vor. Wird dies auch für den paternalen Elter angenommen, zeigen 4/5 der sterilen Pflanzen der Nachkommenschaft keine Temperatursensitivität und bilden folglich auch unter hohen Temperaturen die CMS aus (vgl. Tabelle 4.12). 1/5 der sterilen Pflanzen wird dagegen ausschließlich durch das *b*-Gen bedingt. Sind alle diese Pflanzen Temperatur-sensitiv, so läßt sich das gefundene Spaltungsverhältnis von 4 sensitiven zu 13 insensitiven Pflanzen (Tabelle 4.5) bezogen auf alle sterilen der Nachkommenschaft erklären. Es zeigt keine signifikante Abweichung von dem erwarteten Verhältnis von 1:4 (χ^2 -Wert: 0,00). Diese Hypothese setzt voraus, daß die Temperatursensitivität der *b*-Sterilität durch die dominanten Allele der Gene *Y/y* und *Z/z* bedingt wird und diese bei dem maternalen Elter homozygot vorliegen. Die Kreuzung hätte demnach zwischen den Genotypen (S=4)*xxttBbYYZZ* und (5)*XxttBbYyZz* stattgefunden, so daß alle Nachkommen jeweils mindestens ein dominantes Allel an den Loci *Y/y* und *Z/z* tragen und somit Temperatur-sensitiv bezüglich der *b*-Sterilität sind.

Doch auch die Hypothese, daß die Temperatur-insensitivität der *b*-Sterilität durch die komplementäre Wirkung der dominanten Allele der Loci *Y/y* und *Z/z* hervorgerufen wird,

kann mit den gefundenen Spaltungsverhältnissen erklärt werden. Als Ursache für die Aufspaltung Temperatur-sensitiver und -insensitiver Genotypen in der Nachkommenschaft ist dann eine Aufspaltung am *T/t*-Locus anzunehmen. In diesem Falle wäre die genetische Konstitution der Eltern (S=4)*xxttBbYYZZ* und (5)*XxTtBbYyZz*. In der Kreuzungsnachkommenschaft erfolgt eine Aufspaltung von 1:1 bezüglich des *T*-Gens. Von der Temperatursensitivität wären also die Hälfte der Pflanzen mit ausschließlichem CMS-Typ, (S)*xxB.*, betroffen. Dies ist die Hälfte von 3/5 aller sterilen Pflanzen der Nachkommenschaft (vergl. Tabelle 4.12). Die gefundene Aufspaltung von 4:13 weicht nicht signifikant von dem somit zu erwartendem Verhältnis von 3:10 ab (χ^2 -Wert: 0,08), so daß auch dieser Vererbungsmodus nach den durchgeführten Untersuchungen nicht ausgeschlossen werden kann.

Schließlich wäre es denkbar, daß in der Kreuzungsnachkommenschaft ausschließlich das *b*-Gen spaltet, das gefundene Verhältnis von 17 sterilen zu 13 fertilen Pflanzen bei 20°/12°C somit als eine 1:1-Spaltung interpretiert werden würde. Dies setzt voraus, daß bei 2023/14 das Restorer-gen *X/x* in dominanter Form vorliegt, und in der Kreuzungsnachkommenschaft aufgrund der Restoration keine CMS-Pflanzen auftreten können. Die Temperaturreaktion der *b*-sterilen Pflanzen dieser Nachkommenschaft wäre dann damit zu erklären, daß die Insensitivität durch die dominanten Allele der Loci *Y/y* und *Z/z* bedingt wird, und bei dem maternalen Elter der Kreuzung diese Gene rezessiv vorliegen. Die Eltern hätten demnach die genetischen Konstitutionen (S)*xxttBbyyzz* und (5)*XX.BbYyZz*. In der Nachkommenschaft wäre eine Aufspaltung von insensitiven und sensitiven Pflanzen im Verhältnis 3:1 zu erwarten. Die gefundene Aufspaltung von 13:4 weicht davon nicht signifikant ab. Allerdings erscheint die Annahme unwahrscheinlich, daß bei dem maternalen Kreuzungselter 4 von 5 betrachteten Loci rezessiv vorliegen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß ein rezessives Gen *b* eine männliche Sterilität bedingt, die durch hohe Temperaturen bei einigen Genotypen wieder aufgehoben werden kann. Wie diese Sensitivität gegenüber den hohen Temperaturen vererbt wird, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden. Die dargestellten Modelle zur Interpretation der beobachteten Spaltungsverhältnisse machen eine komplementäre Genwirkung gegenüber einem monogenen Erbgang wahrscheinlicher, können letzteren aber nicht ausschließen. Zudem wurden die Modelle zur Erklärung der Spaltungsverhältnisse unter der Annahme einer freien Spaltung aller beteiligter Loci entwickelt. Es wäre jedoch auch denkbar, daß das *b*-Gen in Attraktionskopplung mit einem rezessiven Temperatur-Sensitivitätsgen vorliegt, und sich die Abweichung von dem bei freier Spaltung zu erwartenden 3:1-Verhältnis (insensitiv : sensitiv) in der Selbstungsnachkommenschaft aufgrund der Kopplung ergibt. Ebenso könnte eine Repulsionskopplung mit einem dominanten Temperatur-Sensitivitätsgen vorliegen.

5 Bedeutung und Nutzungsmöglichkeiten der Umweltvariabilität bei CMS- und GMS-Systemen

5.1 Einleitung

Zur Erhaltung der genetischen Variabilität ist es notwendig, nicht nur ein CMS-System zur Herstellung von Hybridsaatgut zu verwenden. Die Organellen, Mitochondrien und Chloroplasten, können als cytoplasmatische Erbträger bei der Ausprägung verschiedener agronomisch wichtiger Merkmale von Bedeutung sein. Insbesondere betrifft dies Merkmale, die direkt von der Stoffwechselleistung der Organellen abhängig sind, wie die Ausfärbung der Blätter (z. B. bei Zierpflanzen, TILNEY-BASSET 1991) oder die Ölgehalte und deren Zusammensetzung. Diesbezügliche Effekte verschiedener Cytoplasmotypen sind unter anderem bei Sesam (MOSJIDIS und YERMANOS 1984), der Sonnenblume (SPIROVA 1993) und Soja (MILLER et al. 1996) beschrieben worden. Dabei können die beobachteten Veränderungen nicht nur ausschließlich cytoplasmatisch vererbt werden, sondern auch durch Interaktionen mit verschiedenen Kerngenomen entstehen.

Aber auch andere agronomisch wichtige Merkmale können durch cytoplasmatische Erbfaktoren bedingt sein. Ein klassisches Beispiel für die durch einen bestimmten Cytoplasmotyp bedingte Anfälligkeit gegen Schaderreger ist die in Kapitel 7 genauer beschriebene spezifische Interaktion zwischen dem T-Cytoplasma vom Mais und den pilzlichen Pathogenen *Bipolaris maydis* (Rasse T) und *Phyllosticta maydis*, den Erregern des "southern corn leaf blight" und "yellow leaf blight". Der fast ausschließliche Anbau von Maishybriden mit dem T-Cytoplasma führte 1969 bis 1971 zu einer epidemischen Ausbreitung dieser Krankheiten und zur Vernichtung eines Großteils der Ernte (ULLSTRUP 1972, LEVINGS und SIEDOW 1992). Weiterhin wurden beim Mais signifikante cytoplasmatische Einflüsse auf die Anfälligkeit mit falschem Mehltau (*Peronosclerospa sorghi*; BORGES 1987) und beim Weizen auf den Befall mit echtem Mehltau (*Erysiphe graminis*; VOLUEVICH und BULOICHIK 1992) nachgewiesen. Bei *Sorghum* wird die Anfälligkeit gegen das Schadinsekt *Schizaphis graminum* durch cytoplasmatische Erbfaktoren beeinflusst (DIXON et al. 1990).

Auch Anfälligkeiten eines bestimmten Cytoplasmotyps gegen abiotische Schadfaktoren sind denkbar, so konnte bei CMS-Pflanzen von *Sorghum* eine Anfälligkeit der Cytochrom-C-Oxidase gegen Kohlenmonoxid nachgewiesen werden (MUNJAL et al. 1988). In der Rapszüchtung führten die natürlich vorkommenden Sterilitätscytoplasmen 'Nap' und

'Polima' unter dem Einfluß höherer Temperaturen nicht zu einer stabilen Sterilitätsausprägung und entsprechende Saatgutelteren sind in der Hybridzüchtung nicht befriedigend (FAN und STEFFANSON 1986). Deshalb wurde mittels Protoplastenfusion das nach OGURA (1968) benannte Sterilitätscytoplasma aus *Raphanus sativus* in *Brassica napus* übertragen. Es bedingt auch in dieser Art eine umweltstabile männliche Sterilität (BANNEROT et al. 1974; PELLETIER et al. 1983). Pflanzen mit dem 'Ogura'-Cytoplasma zeigen jedoch bei tiefen Temperaturen Chlorosen (BANNEROT et al. 1977). Dieses Problem konnte erst durch Protoplastenfusion gelöst werden, bei der ein Austausch der Chloroplasten von *Raphanus sativus* durch diejenigen aus *Brassica* erfolgte, während die Mitochondrien als Erbträger der CMS erhalten blieben (MENCZEL et al. 1987).

Cytoplasmatische Effekte können auch die Eignung von Pflanzen für *in vitro*-Kulturtechniken beeinflussen. Dies ist für die züchterische Arbeit von zunehmender Bedeutung, da beispielsweise mittels Haploidenkultur in kurzer Zeit homozygote Linien für die Hybridzüchtung entwickelt werden können, oder der Einsatz der Gentechnik nur in Systemen mit guter Regenerationsfähigkeit möglich ist. Einflüsse des Cytoplasmas auf die *in vitro*-Kultureignung wurden unter anderem beim Mais bezüglich der Induktion von embryonischem Kallusgewebe (CHERNYSHEVA und SHAMINA 1991) sowie beim Reis (YAN et al. 1996) und Weizen (EKIZ und KONZAK 1991) bezüglich der Regenerationsfähigkeit nach Antherenkultur festgestellt.

Neben den cytoplasmatisch bedingten Einflüssen können auch die in einem CMS-System involvierten Kerngene Effekte auf wichtige agronomische Merkmale hervorrufen. Das Restorergerm des 'Ogura'-Cytoplasmas (s. o.) wurde durch homologe Rekombination in einer intergenerischen Kreuzung aus *Raphanus sativus* in das Kerngenom von *Brassica napus* integriert, doch durch die Introgression des Chromosomenfragments traten zunächst meiotische Störungen auf, so daß etliche Rückkreuzungen notwendig waren, um ausreichend fertile Restorerlinien zu entwickeln (HEYN 1976 in DELOURME et al. 1998). Durch enge Kopplung dieses Restorergens mit einem Locus, der einen hohen Glukosinolat-Gehalt bedingt, ist es dennoch bis heute nicht gelungen, mit diesem CMS-System die erwünschten 00-Rapshybriden zu züchten (DELOURME et al. 1998, RENARD et al. 1998).

Auch bei GMS-Genen wurden pleiotrope Effekte nachgewiesen, so hängt beispielsweise die allgemeine Kombinationseignung verschiedener nahe isogener *ms*-Mutanten der Tomate von dem jeweils vorliegendem Sterilitätsgen ab (BAR und FRANKEL 1993). Besonders wichtig erscheinen in diesem Zusammenhang Mutationen, die wachstumsregulatorische Funktionen betreffen. Eine derartige Verknüpfung von männlicher Sterilität und wachstumsregulatorischer Funktion führt bei Mutanten von *Arabidopsis thaliana* zu einer Pseudomonaden-Toleranz: Es wurden 14 Mutanten selektiert, die gegen das Phytoxin Koronatin resistent sind, das unter anderem von *Pseudomonas syringae* produziert

wird. Alle diese Mutanten waren gleichzeitig männlich steril und insensitiv gegen einen Wachstumsregulator (Methyljasmonat), der wahrscheinlich die gleiche physiologische Funktion hat, wie das Phytotoxin (FEYS et al. 1994).

Dieser Überblick zeigt, dass die Erhaltung der genetischen Variabilität eine wichtige Voraussetzung ist, um langfristig verschiedene Systeme zu entwickeln, mit denen die Erzeugung von Hybridsaatgut möglich ist. Nur so ist gewährleistet, gegenwärtig das vorteilhafteste System nutzen zu können, zukünftig aber über Reserven zu verfügen, falls dieses System aus einem der genannten Gründe nicht mehr anwendbar sein sollte. Es wurden auch gentechnische Ansätze zur Erzeugung männlicher Sterilität entwickelt, beispielsweise "SeedlingTM" der Fa. Plant Genetic Systems, bei dem ein Ribonuklease-Gen spezifisch in den Antheren exprimiert wird und dadurch männliche Sterilität bedingt (MARIANI et al. 1990). Die Restoration kann durch Applikation eines Inhibitorstoffs oder durch das Einbringen eines entsprechenden Gens erfolgen (MARIANI 1992; DE BOTH 1995). Die stabile transgene Expression und die vollständige Ausmerzung fertiler Pflanzen in der mütterlichen Linie mittels eines Herbizids sind für eine stabile männliche Sterilität des Saatgutelters eben so wichtig, wie eine vollständige Restoration durch die Inhibitoren bei der Hybridsorte, wenn diese wie beispielsweise beim Raps notwendig ist. Ob dies bei wechselnden Umweltbedingungen immer gewährleistet ist, bleibt fraglich (RENARD et al. 1998). Die Probleme gentechnisch erzeugter männlicher Sterilitäten unterscheiden sich also nicht von denen in natürlichen Systemen. Zudem bergen die gentechnischen Ansätze im gegenwärtigen Stadium die Gefahr einer zu starken Einengung der genetischen Variabilität. Dies wird dadurch bedingt, daß in der Regel die zu entwickelnden Linien nur auf einige wenige Regenerate zurückgehen, und die gezielte Suche nach neuen männlichen Sterilitätsformen und mit ihnen gekoppelten Merkmalen unterbleibt.

Im folgenden wird die neue CMS beim Schnittlauch und auch die beiden GMS-Formen *Wi/wi* und *St1/st1* in einer ersten Analyse bezüglich ihrer Reaktion auf hohe Temperaturen und die Applikation von Tetracyclin untersucht. Dies soll Aufschluß darüber geben, ob diese Sterilitätssysteme eine stabile Ausprägung zeigen, oder ob die Variation der Umweltbedingungen eine fertilitätsfördernde Wirkung haben kann. Neben der Bedeutung, die die Ergebnisse dieser Untersuchungen für die Nutzung dieser Sterilitätssysteme in der praktischen Züchtung haben, können sie auch Hinweise auf die molekulare Funktion geben. Sollte beispielsweise die Tetracyclinbehandlung einen fertilitätsfördernden Einfluß auf die Ausprägung eines der GMS-Gene haben, ist die Wahrscheinlichkeit groß, daß auch bei der GMS die Mitochondrien involviert sein könnten. Diese Versuche vervollständigen also den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Vergleich von GMS und CMS. Anschließend werden die Nutzungsmöglichkeiten verschiedener Sterilitätssysteme bei der züchterischen Bearbeitung einer Pflanzenart in Abhängigkeit von der Stabilität ihrer

Ausprägung am Beispiel des Schnittlauchs und ausgewählter anderer Pflanzenarten diskutiert.

5.2 Material und Methoden

5.2.1 Pflanzenmaterial

Als Pflanzenmaterial für die Temperatur- und Tetracyclinversuche dienten spaltende Linien, deren Einzelpflanzen vegetativ vermehrt wurden. Dabei wurden hauptsächlich vorab selektierte sterile Pflanzen dieser Linien verwendet, einige fertile Pflanzen dienten als Kontrollen. Die Linien waren teilweise vorhandenen, teilweise entstammen sie den in Kapitel 4 beschriebenen Kreuzungsanalysen. Linien- und Einzelpflanzennummern sind der Tabelle 5.1 zu entnehmen. Die Pflanzen wurden im Januar aus dem Freiland geholt und geteilt. Nach Akklimatisierung für 1 Woche bei etwa 7°C erfolgte die Aufstellung der Klonteile in 5 Kabinen bei 20°C/12°C (Tag/Nacht). Mit der Tetracyclinbehandlung und der Variation der Temperaturbedingungen wurde begonnen, als die erste Knospe sichtbar war. Bis zur Bonitur der ersten geöffneten Blüten vergingen mindestens 3 Wochen bei der höchsten Temperaturstufe und ca. 6 Wochen bei den tiefsten Temperaturen.

5.2.2 Tetracyclinapplikation

Die Tetracyclinapplikation erfolgte durch Spritzung der Tetracyclinlösung (500ppm) zweimal wöchentlich bis zum Ende der Bonitur. Die Tetracyclinbehandlung wurde bei zwei Temperaturvarianten durchgeführt: Bei 20°/12°C (Tag/Nacht, entsprechend der Kontrolle) und konstant 24°C. Die Behandlung von Tetracyclin-sensitiven Genotypen der alten CMS zeigt bei 20°/12°C einen starken fertilitätsfördernden Einfluß. Diese Pflanzen sind bei einer zweimaligen Behandlung pro Woche nahezu vollständig fertil. Bei höheren Tetracyclinkonzentrationen entstehen Schäden an den vegetativen Organen (TATLIOGLU 1986; TATLIOGLU und WRICKE 1988; vergl. auch Tabelle 11.6 im Anhang). Die Bonitur der Dolden erfolgte wie in Abschnitt 4.2.3 beschrieben.

5.2.3 Variation der Temperaturbedingungen

Neben der Kontrollvariante (20°/12°C Tag/Nacht) wurden zwei Varianten mit hohen Temperaturen durchgeführt: 24°/24°C und 30°/24°C (Tag/Nacht). Bei der alten CMS erfolgt bei Temperatur-sensitiven Genotypen bei 24°/24°C eine vollständige Restoration der Fertilität (TATLIOGLU 1985, 1987; vergl. auch Tabelle 11.6 im Anhang).

5.2.4 Erfassung des Blütezeitpunktes

Nach der Aufstellung der Klonteile bei den verschiedenen Varianten fiel auf, daß eine erhebliche Variabilität in der Entwicklungsgeschwindigkeit zwischen den Linien besteht. Insbesondere die Linien mit dem neuen Sterilitätszytoplasma (5) schienen sich schneller zu

entwickeln als die übrigen Linien. Da dies für die Züchtung früher und später Schnittlauchsorten und insbesondere für die Treiberei von Bedeutung ist, wurde als Indikator für die Frühzeitigkeit bzw. eine schnelle Entwicklungsfähigkeit der Blütezeitpunkt der Genotypen bei zwei Temperaturvarianten erfaßt. Mit der Bonitur dieses Merkmals wurde an dem Tag begonnen, als sich in der jeweiligen Temperaturvariante bei der ersten Knospe die Spatha öffnete (Tag 0). Die Tage bis zum Aufplatzen der jeweils ersten und zweiten Knospe wurden bei allen Genotypen gezählt. Die Bonitur erfolgte dreimal wöchentlich in den Kabinen mit 20°/12°C und 24°/24°C. Dabei wurden auch die mit Tetracyclin behandelten Klonteile der jeweiligen Temperaturstufe berücksichtigt, um eine größere Knospenzahl zu erhalten und somit zufällige Schwankungen zu minimieren. Aus der Zahl der Tage bis zum Aufplatzen der ersten und zweiten Knospe wurde der Mittelwert errechnet, wenn die Differenz nicht größer als 7 Tage war, da solche Differenzen nur bei sehr kleinen Klonteilen mit wenigen Blüten auftraten und folglich für die Beurteilung der Entwicklungsgeschwindigkeit nicht geeignet erschienen. Zur statistischen Absicherung, daß sich die Mittelwerte für den Blütezeitpunkt zwischen den untersuchten Cytoplasmatypen unterscheiden, wird eine einfaktorielle Varianzanalyse durchgeführt. Diese weist nach, ob mindestens ein Mittelwert von den übrigen verschieden ist. Anschließend erfolgt dann ein Vergleich der Mittelwerte mit einem *a posteriori* – Testverfahren für einen Versuchsaufbau mit ungleicher Wiederholungszahl (Test nach SCHEFFÉ in WEBER 1986).

5.3 Ergebnisse

5.3.1 Boniturdaten

Im vorderen Teil der Tabelle 5.1 sind die Tage bis zum Aufplatzen der Spatha der ersten und zweiten Knospe jedes Genotyps aufgeführt, beginnend mit der ersten geöffneten Spatha in der jeweiligen Temperaturvariante (Tag 0). Neben den Werten für die beiden Knospen ist der Mittelwert angegeben. Im hinteren Block der Tabelle sind die Boniturnwerte der Sterilität/Fertilität in den verschiedenen Temperaturstufen und nach Tetracyclinbehandlung angegeben.

Tab. 5.1: Erfassung der Variabilität des Blütezeitpunktes und Bonitur der Sterilität/Fertilität nach Temperatur- und Tetracyclinversuchen bei Pflanzen der neuen CMS sowie bei Pflanzen der *wi*- und *st1*-GMS. Bei der Bonitur gibt die erste Zahl die Anzahl bonitierter Dolden, die zweite Zahl den Boniturwert wieder (0 = steril, 4 = fertil).

Sterilität und Pflanzennummer	Tage bis zum Aufblühen bei 20°/12°C, Knospe			Tage bis zum Aufblühen bei 24°/24°C, Knospe			Bonitur der Sterilität bei den Temperaturen [°C]				
	1	2	Mittel	1	2	Mittel	20°/12° Kontrolle	20°/12° +Tetrac.	24°/24°	24°/24° +Tetrac.	30°/24°
(5) <i>st2st2</i> :											
10031/5	1	3	2	4	9	6,5	4 x 4	6 x 4	1 x 4	-	
8	0	0	0	3	5	4	7 x 0	8 x 0	4 x 0	8 x 0	-
11	4	4	4	9	9	9	4 x 0	4 x 0	6 x 0	4 x 0	5 x 0
14	8	9	8,5	5	12	8,5	6 x 0	2 x 0	7 x 0	7 x 0	5 x 0
20	3	4	3,5	11	11	11	10 x 0	3 x 0	3 x 0	4 x 0	5 x 0
25	4	4	4	6	6	6	8x0, 1x4	9x0, 2x4	9x0, 2x4	4x0, 3x4	5x0, 3x4
27	4	5	4,5	5	6	5,5	10 x 4	7 x 4	3 x 4	6 x 4	7 x 4
10032/2	9	11	10	4	9	6,5	3 x 0	6 x 0	10 x 0	3 x 0	7 x 0
10	7	7	7	6	9	7,5	4 x 0	3 x 0	4 x 0	-	-
12	3	3	3	5	9	7	5 x 0	4 x 0	3 x 0	3 x 0	-
10033/2	7	9	8	5	5	5	8 x 0	3 x 0	10 x 0	6 x 0	5 x 0
5	8	8	8	6	9	7,5	4 x 0	5 x 0	10 x 0	3 x 0	4 x 0
10	9	10	9,5	6	9	7,5	4 x 0	3 x 0	5 x 0	6 x 0	3 x 0
12	1	3	2	3	4	3,5	6 x 0	4 x 0	4 x 0	6 x 0	2 x 0
14	9	10	9,5	6	9	7,5	5 x 0	10 x 0	6 x 0	5 x 0-1	7 x 3-4
10037/4	9	9	9	9	9	9	7 x 0	3 x 0	7 x 0	6 x 0	10 x 0
8	11	14	12,5	12	12	12	4 x 0	1 x 0	9 x 0	10 x 0	6 x 0
10	7	8	7,5	-	-	-	4 x 4	3 x 4	-	-	-
11	8	8	8	8	9	8,5	12 x 0	5 x 0	10 x 0	15 x 0	8 x 0
10038/1	7	7	7	-	-	-	5 x 4	4 x 4	-	-	1 x 4
7	7	7	7	5	5	5	1 x 0	5 x 0	9 x 0	7 x 0	5 x 0
9	7	7	7	5	5	5	4 x 0	4 x 0	7 x 0	5 x 0	6 x 0
10040/3	26	29	27,5	23	32	-	2 x 4	-	1 x 4	2 x 4	-
5	15	15	15	15	16	15,5	7 x 4	1 x 4	1 x 4	6 x 4	5 x 4
8	22	24	23	16	16	16	3 x 0	3 x 0	3 x 0	2 x 0	2 x 0
10	22	24	23	17	18	17,5	1 x 4	1 x 4	3 x 4	-	-
11	28	35	31,5	16	24	-	1 x 4	1 x 4	2 x 4	1 x 4	-
14	22	24	23	-	-	-	4 x 4	7 x 4	-	-	-
19	14	14	14	12	18	15	1 x 4	10 x 4	2 x 4	1 x 4	-
20	16	22	19	17	18	17,5	2 x 0	5 x 0	4 x 0	2 x 0	-
34	14	16	15	-	-	-	2 x 0	-	-	-	-
36	22	25	23,5	20	31	-	2 x 0	1 x 0	1 x 0	3 x 0	-
38	14	16	15	10	20	-	2 x 0	1 x 0	1 x 0	1 x 0	-
41	22	22	22	20	24	22	2 x 0	4 x 0	1 x 0	1 x 0	3 x 0
45	10	11	10,5	10	13	11,5	4 x 0	1 x 0	1 x 0	4 x 0	1 x 0
51	14	14	14	11	12	11,5	5 x 0	4 x 0-1	2x1, 1x3	3x0, 1x3	-
53	14	22	-	16	-	-	5 x 0	4 x 0	1 x 0	1 x 0	1 x 0
55	15	22	18,5	-	-	-	2 x 0	-	-	-	1 x 0
56	22	35	-	23	25	24	1 x 0	2 x 0	-	1 x 0	1 x 0
60	25	28	26,5	16	16	16	3 x 0	2 x 0	5 x 0	-	3 x 0
61	25	28	26,5	-	-	-	2 x 0	-	-	-	-
63	22	22	22	-	-	-	3 x 0	2 x 0	-	-	2 x 0
64	30	-	-	16	18	17	1 x 0	2 x 0	2 x 0	1 x 0	-
66	24	25	24,5	19	23	21	2 x 0	1 x 0	-	-	3 x 0-1
67	22	22	22	31	-	-	4 x 0	1 x 0	1 x 0	1 x 0	6 x 0
68	24	25	24,5	13	17	15	4 x 0	5 x 0	1 x 0	5 x 0	4 x 0
10041/14	15	22	18,5	18	-	-	2 x 4	5 x 4	-	1 x 4	-
20	7	7	7	0	1	0,5	17 x 0	18 x 0	9 x 0	6 x 0	4 x 0
22	22	22	22	-	-	-	2 x 0	-	-	-	-
23	7	8	7,5	9	-	-	5 x 4	4 x 4	-	-	-

Fortsetzung von Tabelle 5.1

Sterilität und Pflanzennummer	Tage bis zum Aufblühen bei						Bonitur der Sterilität bei den Temperaturen [°C]				
	20°/12°C, Knospe			24°/24°C, Knospe			20°/12°	20°/12°	24°/24°	24°/24°	30°/24°
	1	2	Mittel	1	2	Mittel	Kontrolle	+Tetrac.	+Tetrac.	+Tetrac.	
27	7	10	8,5	2	3	2,5	3 x 4	4 x 4	5 x 4	-	-
33	11	22	-	2	5	3,5	2 x 0	1 x 0	3 x 0	-	2 x 0
34	1	3	2	12	12	12	5 x 0	2 x 0	-	-	-
47	8	9	8,5	9	10	9,5	6 x 0	-	1 x 0	1 x 4	-
54	7	8	7,5	-	-	-	2 x 0	1 x 0	-	-	-
56	11	14	12,5	9	9	9	10 x 0	1 x 0	6 x 0	6 x 0	5 x 0
10042/5	7	14	10,5	6	10	8	5 x 4	6 x 4	2 x 4	3 x 4	-
9	9	14	11,5	10	10	10	7 x 4	3 x 4	5 x 4	7 x 4	4 x 4
19	14	14	14	9	10	9,5	3 x 0?	4 x 2	7 x 4?	-	4 x 4
20	4	5	4,5	4	5	4,5	6 x 4	1 x 4	4 x 4	1 x 4	-
25	17	17	17	-	-	-	3 x 4	4 x 4	-	-	-
26	7	7	7	5	6	5,5	8 x 0	5 x 0	12 x 0	5 x 0	11 x 0
31	8	8	8	9	9	9	8 x 0	11 x 0	7 x 0	5 x 0	2 x 0
32	22	23	22,5	18	18	18	3 x 0	3 x 0	6 x 0	2 x 0	4 x 0
41	0	0	0	0	1	0,5	6 x 0	10 x 0	12 x 0	10 x 0	5 x 0
50	15	22	18,5	9	9	9	3 x 0	2 x 0	5 x 0	-	-
(1)wiwi											
11013/2	14	15	14,5	-	-	-	4 x 4	2 x 0	-	-	2 x 0
22	17	22	19,5	23	-	-	1 x 0	1 x 0	1 x 0	-	-
85	10	10	10	10	12	11	7 x 4	-	3 x 4	-	-
86	10	14	12	12	16	14	4 x 4	3 x 4	2 x 4	3 x 4	-
11022/43	22	28	36	16	16	16	1 x 0	2 x 0	4 x 0	-	-
46	22	22	22	17	18	17,5	1 x 0	3 x 0	4 x 0	-	-
49	25	25	25	-	-	-	2 x 4	1 x 4	-	-	-
52	22	22	22	16	16	16	1 x 0	8 x 0	2 x 0	6 x 0	-
68	24	28	26	17	16	16,5	1 x 0	1 x 0	3 x 0	-	-
(2)wiwi											
11029/14	25	28	26,5	19	23	21	2 x 4	4 x 4	5 x 4	-	-
19	22	22	22	17	19	18	3 x 0	3 x 0	1 x 0	-	-
25	22	24	23	-	-	-	1 x 0	6 x 0	-	-	-
30	16	16	16	16	16	16	2 x 0	6 x 0	4 x 0	-	-
31	17	22	19,5	16	16	16	1x0, 2x4	1 x 4	2x0, 2x4	3x0, 5x4	4 x 4
40	22	22	22	-	-	-	2 x 0	-	-	-	-
43	28	28	28	17	19	18	2 x 0	3 x 0	2 x 0	-	-
44	16	22	19	13	13	13	3 x 0	5 x 0	4 x 0	-	-
54	24	28	26	17	33	-	1 x 2	2 x 2	1 x 0	-	-
59	24	24	24	19	20	19,5	3 x 4	1x1, 3x4	1 x 0	-	-
67	22	22	22	16	16	16	1 x 4	3 x 4	-	-	-
70	11	14	12,5	17	17	17	3 x 0	1 x 0	2 x 0	-	-
75	11	16	13,5	20	31	-	4 x 0	4 x 0	1 x 0	-	-
76	22	22	22	16	17	16,5	4 x 4	1x0, 1x4	2 x 0	-	-
86	14	16	15	19	23	21	3 x 0	2 x 0	-	-	1 x 0
91	22	28	25	-	-	-	2 x 0	3 x 0	-	-	1 x 0
93	14	17	15,5	16	17	16,5	4 x 0	3 x 0	3 x 0	-	-
101	9	10	9,5	31	-	-	6 x 0	3 x 0	-	-	-
103	28	30	29	-	-	-	1 x 0	6 x 0	-	5 x 0	-
11038/8	14	16	15	16	16	16	4 x 4	3 x 4	3 x 4	1 x 4	2 x 4
17	11	14	12,5	16	16	16	6 x 0	5 x 0	1 x 0	-	-
22	10	15	12,5	-	-	-	6 x 0	3 x 0	1 x 0	1 x 0	-
40	10	11	10,5	13	-	-	7 x 0	7 x 0	4 x 0	2 x 0	8 x 0
49	14	22	-	16	-	-	2 x 0	4 x 0	1 x 0	-	1 x 0
52	22	22	22	19	19	19	3 x 0	3 x 0	3 x 0	1 x 0	1 x 0
68	22	22	22	13	13	13	3 x 0	5 x 0	5 x 0	6 x 0	1 x 0
71	14	14	14	17	25	-	6 x 0	2 x 0	1 x 0	3 x 0	2 x 0
77	14	15	14,5	13	19	16	6 x 0	2 x 0	1 x 0	-	1 x 0

Fortsetzung von Tabelle 5.1

Sterilität und Pflanzennummer	Tage bis zum Aufblühen bei			24°/24°C, Knospe			Bonitur der Sterilität bei den Temperaturen [°C]				
	20°/12°C, Knospe			24°/24°C, Knospe			20°/12°	20°/12°	24°/24°	24°/24°	30°/24°
	1	2	Mittel	1	2	Mittel	Kontrolle	+Tetrac.	+Tetrac.		
11070/22	22	24	23	16	16	16	1 x 0	1 x 0	2 x 0	3 x 0	-
27	9	9	9	9	12	10,5	9 x 4	7 x 4	2 x 4	5 x 4	-
28	14	22	-	9	10	9,5	3 x 0	4 x 0	5 x 0	-	-
34	10	16	13	13	13	13	6 x 0	1 x 0	2 x 0	1 x 0	-
(2)st1st1:											
10046/3	16	22	19	13	17	15	7 x 0	2 x 0	3 x 0	5 x 0	-
4	16	22	19	16	16	16	1 x 0	1 x 0	2 x 0	8 x 0	-
9	24	24	24	20	23	21,5	3 x 0	1 x 0	6 x 0	3 x 0	-
11	14	15	14,5	-	-	-	5 x 0	3 x 0	-	-	-
15	14	14	14	9	9	9	2 x 0	6 x 0	5 x 0	3 x 0	2 x 0
16	22	28	25	-	-	-	2 x 0	-	-	-	-
19	14	22	18	10	12	11	1 x 0	8 x 0	5 x 0	4 x 0	-
10047/20	5	17	-	5	13	-	4 x 0	3 x 0	2 x 0	-	5 x 0
30	14	16	15	12	12	12	2 x 0	3 x 0	3 x 0	3 x 0	5 x 0
37	24	25	24,5	-	-	-	2 x 0	2 x 0	-	-	-
10048/1	17	22	19,5	13	-	-	4 x 0	2 x 0	1 x 0	2 x 0	-
3	28	28	28	-	-	-	2 x 4	3 x 4	-	-	-
10	15	19	17	10	13	11,5	2 x 4	9 x 4	6 x 4	4 x 4	10 x 4
30	14	14	14	12	13	12,5	5 x 0	5 x 0	4 x 0	7 x 0	-
10053/1	29	35	-	23	24	23,5	3 x 4	1 x 4	3 x 4	-	-
4	28	35	31,5	23	23	23	2 x 0	1 x 0	-	3 x 0	1 x 0
11	22	28	25	19	19	19	1 x 4	7 x 4	3 x 4	4 x 4	6 x 4
13	30	42		23	25	24	1 x 0	1 x 0	2 x 0	-	-
14	32	32	32	-	-	-	3 x 4	2 x 4	-	3 x 4	1 x 4
16	25	29	27	31	31	31	1 x 4	1 x 4	-	-	1 x 4
18	29	36	32,5	23	25	24	1 x 0	2 x 0	2 x 0	3 x 0	1 x 0
23	29	32	30,5	18	18	18	4 x 0	-	2 x 0	1 x 0	2 x 0
24	42	42	42	25	-	-	2 x 0	1 x 0	1 x 0	-	-
25	29	29	29	23	31	-	3 x 0	-	2 x 0	-	-
28	35	37	36	31	31	31	1 x 0	2 x 0	2 x 0	-	-
32	22	35	-	18	25	21,5	1 x 0	1 x 0	2 x 0	-	-
33	32	35	33,5	24	24	24	2 x 0	1 x 0	2 x 0	-	-
39	28	35	31,5	19	20	19,5	2 x 0	2 x 0	3 x 0	-	1 x 0
40	28	29	28,5	23	25	24	2 x 4	3 x 4	1 x 4	3 x 4	1 x 4

5.3.2 Variabilität des Blütezeitpunktes in den untersuchten Nachkommenschaften

Ein Vergleich der Linien betreffend ihres Blütezeitpunktes bestätigt die Annahme, daß sich die Linien mit dem neuen Sterilitätscytoplasma (5) schneller entwickeln als die Linien mit den Cytoplasmotypen (1) und (2). Dabei sind die Linien 10040 und 10053 nicht mit den übrigen vergleichbar, da diese im Vorjahr bis in den Herbst im Gewächshaus kultiviert wurden, während die anderen den Sommer über im Freiland standen. Eine negative Beeinflussung der Gewächshauskultur auf das Blühverhalten des Schnittlauchs wurde auch bei anderen Versuchen beobachtet, insbesondere, wenn die Ruheinduktion nach KRUG und FÖLSTER (1976) im Gewächshaus erfolgte (vergl. 3.2.1 und 3.4.1).

Um die Unterschiede bezüglich des Blütezeitpunktes der Linien mit verschiedenen Cytoplasmotypen statistisch abzusichern, wird zunächst eine einfaktorielle Varianzanalyse

durchgeführt, und anschließend erfolgt ein Mittelwert-Vergleich mit dem SCHEFFÉ-Test. Jeder Meßwert des Blütezeitpunktes setzt sich aus dem Gesamtmittelwert aller Meßwerte, dem Effekt des Cytoplasmas und einem Rest-Fehler zusammen. Die Varianzanalyse zerlegt die Gesamtvarianz nach ihren Ursachen in die Streuungskomponente zwischen den Cytoplasmatypen und die Streuungskomponente innerhalb der Cytoplasmatypen. Während die Variabilität zwischen den Linien durch den Effekt des Cytoplasmas hervorgerufen wird, ist die Variabilität innerhalb eines Cytoplasmatyps durch den Rest-Fehler bedingt. Aus dem Vergleich kann mit Hilfe des Varianzquotienten-Testes (F -Test) eine Aussage getroffen werden, ob bei mindestens einem Cytoplasmatyp der Mittelwert des Blütezeitpunktes von den übrigen verschiedenen ist.

Dazu wird zunächst die Summe der Abweichungsquadrate der Meßwerte vom Gesamtmittelwert wie folgt zerlegt:

$$SQT \text{ (Total)} = SQZ \text{ (Zwischen)} + SQI \text{ (Innerhalb)}$$

$$\sum_{ij} (x_{ij} - \bar{x})^2 = \sum_i (\bar{x}_i - \bar{x})^2 + \sum_{ij} (x_{ij} - \bar{x}_i)^2$$

Zur leichteren Berechnung entsteht nach Umformungen:

$$\left(\sum_{ij} x_{ij}^2 \right) - \left(\frac{T^2}{N} \right) = \left(\sum_i \frac{T_i^2}{n_i} \right) - \left(\frac{T^2}{N} \right) + SQT - SQZ$$

x_{ij} = j -ter Meßwert des i -ten Cytoplasmatyps

\bar{x}_i = Mittelwert des i -ten Cytoplasmatyps

\bar{x} = Mittel aller Meßwerte

Die übrigen Abkürzungen sind der Tabelle 5.2 zu entnehmen.

Tab. 5.2: Berechnung der Mittelwerte für den Blütezeitpunkt in den verschiedenen Cytoplasmatypen

Cytoplasmatyp: i	20°/12°C			24/24°C		
	Summe der Meßwerte: T_i	Zahl der Meßwerte: n_i	Mittelwert: \bar{x}_i	Summe der Meßwerte: T_i	Zahl der Meßwerte: n_i	Mittelwert: \bar{x}_i
(5)	349	41	8,51	253	35	7,23
(1)	187	9	20,78	91	6	15,17
(2)	809,5	43	18,82	446	29	15,38
Summen	$T = 1345,5$	$N = 93$		$T = 790$	$N = 70$	

Durch Anwendung der oben beschriebenen Formel werden die Quadratsummen SQT , SQZ und SQI aus den Tabellen 5.1 und 5.2 berechnet und durch den jeweiligen Freiheitsgrad dividiert, um die mittleren Quadratsummen (oder Varianzen) MQT , MQZ und MQI zu erhalten (die Freiheitsgrade von $SQT = N - 1$ teilen sich auf in $k - 1$ für SQZ und $N - k$ für SQI ; $k = 3$, Zahl der Cytoplasmatypen). $F_{Versuch}$ berechnet sich aus MQZ / MQI , $F_{Tabelle}$ wird bei den Freiheitsgraden ($k - 1$ und $N - k$) und einer Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5\%$

abgelesen. Die berechneten SQ -Werte, Freiheitsgrade, MQ -Werte sowie die Werte für $F_{Versuch}$ und $F_{Tabelle}$ sind in Tabelle 5.3 zusammengefaßt.

Tab. 5.3: Statistische Absicherung der Unterschiede der Mittelwerte für die Blütezeitpunkte der Pflanzen mit verschiedenen Cytoplasmotypen durch einfaktorielles Varianzanalyse

Temperaturstufe	SQ -Werte	Freiheitsgrade	MQ -Werte	$F_{Versuch}$	$F_{Tabelle}$
20°/12°C	$SQT=5539,90$	92			
	$SQZ=1314,58$	2	$MQZ=675,29$		
	$SQI=4225,32$	90	$MQI=46,95$	14,38	3,10
24°/24°C	$SQT=1898,29$	69			
	$SQZ=1152,45$	2	$MQZ=576,23$		
	$SQI=745,83$	67	$MQI=11,13$	51,77	3,13

Da die errechneten F -Werte in beiden Temperaturstufen größer als die Tabellenwerte sind, ist bei beiden Temperaturstufen mindestens ein Mittelwert signifikant von den anderen verschieden.

Für den Vergleich des Mittelwertes des Blütezeitpunkts der Pflanzen mit dem Cytoplasma (5) mit denen der Pflanzen mit den Cytoplasmen (1) oder (2) wird ein SCHEFFÉ-Test durchgeführt. Dazu wird folgender linearer Kontrast aus den Mittelwerten bei 20°/12°C und den geeigneten Koeffizienten gebildet, so daß die Summe der Koeffizienten $c_i = 0$ ergibt.

$$L_{Versuch} = 1 \times 8,51 - 1/2 \times 20,78 - 1/2 \times 18,82 = -11,29$$

$L_{Tabelle}$ wird durch die folgende Formel berechnet:

$$\sqrt{(k-1) \times F_{Tabelle} \times MQI \times \tilde{c}}$$

worin

$$F_{Tabelle} = F_{N-k}^{k-1}(\alpha) \quad \tilde{c} = \sum_{i=1}^k \frac{c_i^2}{n_i}$$

und ergibt durch Einsetzen der Werte

$$\sqrt{(3-1) \times 3,1 \times 46,95 \times 0,058}$$

$$= 4,11.$$

Da $|L_{Versuch}| = 11,29 > 4,11 = L_{Tabelle}$, ist der Blütezeitpunkt der Pflanzen mit dem Cytoplasma (5) von den Pflanzen mit den Cytoplasmen (1) und (2) verschieden (Irrtumswahrscheinlichkeit = 5%).

In analoger Weise ergibt sich für die Temperaturstufe 24°/24°C $|L_{Versuch}| = 8,05 > 2,35 = L_{Tabelle}$, so daß auch hier der Blütezeitpunkt der Pflanzen mit dem Cytoplasma (5) von denen mit den Cytoplasmen (1) und (2) verschieden ist.

5.3.3 Stabilität in der Ausprägung der *wi*- und der *st1*-GMS

Bei den GMS-Genotypen *wiwi* und *st1st1* konnte weder durch hohe Temperaturen (24°/24°C oder 30°/24°C) noch durch Applikation von Tetracyclin in den Temperaturstufen 20°/12°C und 24°/24°C die Ausprägung der Sterilität beeinflusst werden. Auch die fertilen Kontrollpflanzen zeigten keine Reaktion. Lediglich bei vier Pflanzen der Linie 11029 (31, 54, 59 und 76) zeigte sich eine Variabilität in der Sterilitätsausprägung. Da verschiedene Boniturwerte aber auch innerhalb einer Variante festgestellt wurden, ist davon auszugehen, daß während der vegetativen Erhaltung und Vermehrung eine Vermischung oder eine Verunreinigung durch Saatgut erfolgt ist.

5.3.4 Stabilität in der Ausprägung der CMS (5) *st2 st2*

Abgesehen von 6 Genotypen bei 42 untersuchten sterilen Pflanzen der neuen CMS, (5)*st2st2*, wurde weder bei hohen Temperaturen (24°/24°C und 30°C/24°C) noch bei Applikation von Tetracyclin in den Temperaturstufen 20°/12°C und 24°C/24°C eine Förderung der Fertilität nachgewiesen. Lediglich bei den Genotypen 10033/14, 10040/51, 10040/66, 10041/47 und 10042/19 erfolgte Pollenbildung bei zunehmenden Temperaturen. Da bei 10031/25 sterile und fertile Blüten bei allen Varianten auftraten, liegt hier wahrscheinlich eine Vermischung vor, die während der vegetativen Erhaltung entstanden ist.

Auch die restorierten Pflanzen, (5)*St2*., zeigten keine Veränderung hinsichtlich der Fertilität im Vergleich zu den Kontrollen bei 20°/12°C.

5.4 Diskussion

5.4.1 Nutzungsmöglichkeiten der Umweltvariabilität in CMS- und GMS-Systemen

Ein großer Fortschritt bei der Etablierung von Hybridzuchtverfahren wäre gegeben, wenn es gelänge, die häufig auftretenden GMS-Formen besser nutzbar zu machen. Ist es möglich, bei einer GMS durch eine gezielte Variation der Umweltbedingungen oder durch eine Behandlung die Fertilität zu fördern, so können Selbstungen durchgeführt werden. Wird bei der Nachkommenschaft die fertilitätsfördernde Behandlung ausgesetzt, so besteht diese ausschließlich aus sterilen Pflanzen und kann als Saatgutelter in der Hybridsaatgutproduktion eingesetzt werden. Bei der Fertilitätsförderung zur Erhaltung der männlich sterilen Linie sind nur relativ wenige Pflanzen zu behandeln, um ausreichend Pollen für die Befruchtung einer Vielzahl von Pflanzen zu erhalten, so daß die Kosten für die Behandlung nicht zum limitierenden Faktor werden sollten.

Im Gegensatz dazu ist der Aufwand erheblich höher, wenn eine sterilitätsinduzierende Behandlung fertiler Pflanzen erfolgen soll, um diese dann direkt als Saatgutelter bei der

Hybridsaatgutproduktion einsetzen zu können. Bei einem solchen Verfahren muß die gesamte A-Linie bearbeitet werden. Durch die notwendige Behandlung muß gewährleistet sein, daß tatsächlich keine Pollen innerhalb der A-Linie gebildet werden. Dies ist aus technischen Gründen in einem größeren Bestand nur sehr schwer zu erreichen. Zwar sind Gametozide bekannt, mit denen bei einigen Pflanzenarten männliche Sterilität ausgelöst werden kann, diese sind aber meistens im Hinblick auf den Schutz der Umwelt problematisch, teilweise sogar direkt gesundheitsgefährdend. Zudem werden teilweise andere Produktivitätskomponenten, wie die weibliche Fertilität beeinträchtigt. Da sich diese negativen Faktoren alle direkt auf die Produktion des Hybridsaatguts auswirken, hat sich die Anwendung solcher Maßnahmen nicht durchgesetzt (RAO et al. 1990).

Aus den genannten Gründen kommt der weiteren Erforschung der Beeinflußbarkeit von GMS-Systemen große Bedeutung zu, um diese besser nutzbar machen zu können und so in vielen Pflanzenarten die Etablierung von Hybridzuchtverfahren zu ermöglichen. GMS kommt etwa 4x häufiger vor als CMS (KAUL 1988), beispielsweise sind bei der Tomate etwa 50 GMS-Formen bekannt, jedoch keine CMS (GORMAN und MCCORMICK 1997). Auch durch Protoplastenfusion ist es bisher nicht gelungen, ein nutzbares CMS-System zu etablieren, da zwar männlich sterile Pflanzen erzeugt werden konnten (MELCHERS 1992), die Selektion stabiler Restorergene aber bisher nicht gelungen ist, und die Hybriden folglich nur geringen Fruchtansatz zeigen (GORMAN und MCCORMICK 1997).

Ein zusätzlicher Vorteil bei der Nutzung eines Systems mit fertilitätsfördernder Behandlung zur Erhaltung der A-Linie besteht darin, daß diese direkt züchterisch zu bearbeiten ist, und der Aufbau einer B-Linie (Maintainerlinie) und die Rückkreuzungsschritte entfallen. Dieser Vorteil ist auch bei CMS-Systemen nutzbar, wenn die A-Linie gezielt zur Pollenproduktion angeregt werden kann.

Aufgrund der durchgeführten Temperatur- und Tetracyclinversuche kann angenommen werden, daß bei den GMS-Formen *wiwi* und *st1st1* beim Schnittlauch eine fertilitätsfördernde Wirkung durch eine Variation der Temperaturen oder durch eine Tetracyclinapplikation nicht zu erreichen ist. Beide GMS-Gene zeigten bei den durchgeführten Untersuchungen eine stabile Ausprägung der Sterilität.

In der Literatur finden sich nur einige wenige Beispiele, bei denen eine Förderung der Fertilität bei GMS-Genotypen gezielt induzierbar ist. Praktische Bedeutung erlangt ein solches System nur dann, wenn gewährleistet ist, daß die Fertilitätsförderung bei der Hybridsaatgutproduktion unterbleibt. Dies ist bei der Nutzung wechselnder Umweltbedingungen zur Beeinflussung von Sterilität und Fertilität oftmals nicht gewährleistet. Bei der gezielten Applikation von Chemikalien zur Induktion der Pollenbildung stellt sich dieses Problem hingegen nicht. Häufig können Wachstumsregulatoren oder antagonistisch wirkende Chemikalien, die die Synthese oder Wirkung dieser Phytohormone hemmen, zur Förderung der Fertilität eingesetzt werden. Ein gut untersuchtes Beispiel, bei dem sowohl

Temperaturen als auch Wachstumsregulatoren involviert sind, ist die "stamenless", *sl-2*-GMS bei der Tomate, deren Phänotyp bei normalen Temperaturen (23°/18°C) ausgeprägt wird. Die Applikation von Gibberellinsäure (GA₃) oder tiefe Temperaturen (18°/15°C) bedingen die Bildung von Blüten mit normalen Stamina und Pollen, dagegen bewirken hohe Temperaturen (28°/23°C) oder die Applikation von Auxin (Indolessigsäure, IAA) die Umbildung der Stamina in karpelloide Strukturen (SAWHNEY und GREYSON 1973; SAWHNEY 1983). SINGH et al. (1992) wiesen nach, daß bei der *sl-2* Mutante die endogene IAA-Konzentration in den Blättern 10-20x und in den Stamina 5-8x höher ist als in fertilen Wildtypen. Durch abnehmende Temperaturen wird der IAA-Gehalt in den Stamina der Mutanten abgesenkt, bis er sich dem Gehalt der Wildtypen angleicht, und die Stamina beginnen Pollen zu bilden. In den Blättern der Mutante verringert sich der IAA-Gehalt ebenfalls, bleibt aber etwa 10x höher als in den Blättern des Wildtyps. Da die vegetativen Organe der Mutanten und Wildtypen keine morphologischen Unterschiede zeigen, gehen SINGH et al. (1992) davon aus, daß sich der Effekt der erhöhten IAA-Konzentration ausschließlich in den Stamina manifestiert. Bei den Applikationsversuchen mit Gibberellinen wurde bei den fertilen Wildtypen durch zusätzliche Gibberellinabgaben die Weiblichkeit gefördert (SAWHNEY und GREYSON 1973). Die Autoren schließen daraus, daß bei den Wildtypen die Applikation zu einem Überschuß an Gibberellin führt, während bei den *sl-2* Mutanten ein Gibberellinmangel vorliegt, der durch die Applikation aufgehoben werden kann. Dies wurde in späteren Versuchen bestätigt (SAWHNEY 1974).

Auch bei einigen anderen GMS-Formen wurden Temperatureinflüsse auf die Ausprägung der männlichen Sterilität festgestellt. So zeigt eine Mutante vom Broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) bei Temperaturen von 24°/17°C männliche Sterilität, während die Pflanzen bei tieferen Temperaturen (15°/10°C) Pollen bilden. DICKSON (1970) diskutiert, daß diese Eigenschaft für die Hybridsaatgutproduktion nutzbar ist, indem in den Wintermonaten im Gewächshaus Selbstungen der A-Linie durchgeführt werden und im Freiland (New York) von Mitte Juni bis Ende September die Hybridsaatgutproduktion erfolgt. Auch beim Reis existieren GMS-Systeme, die sensitiv auf die Veränderung der Temperatur reagieren. Durch Kartierungen konnten bereits drei solcher TGMS-Gene ("thermo-sensitive genic male-sterile") unterschieden werden, bei denen es sich nicht um Allele eines Gens handelt (zusammengefaßt in SUBUDHI et al. 1997).

In den genannten Beispielen reagieren die Pflanzen in Abhängigkeit von ihrem Genotyp auf Veränderungen der Temperatur. Solche Temperaturreaktionen sind von Hitzestressreaktionen zu unterscheiden, die bei verschiedenen Pflanzenarten zu männlicher Sterilität führen können. Vielleicht bedingt die Hitze in solchen Fällen auch einen Wasserstress, der letztlich die männliche Sterilität auslöst. Insbesondere bei Gräsern wird männliche Sterilität durch Wasserstress beobachtet. Stressfaktoren können auch Kälte, Überflutung oder Nährstoffmangel sein (zusammengefaßt in SAINI 1997). Da Stressfaktoren immer auch

die Gesamtpflanze und folglich auch den zu erwartenden Saatgutertrag negativ beeinflussen, ist ihre pflanzenzüchterische Nutzung kaum möglich. Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Systemen, bei denen spezifische Effekte durch die Variation der Umweltbedingungen hervorgerufen werden können, sind allgemeine Anfälligkeiten gegen Streßfaktoren demnach negativ zu bewerten. Der Schnittlauch scheint wenig anfällig gegen solche Streßfaktoren zu sein, mindestens hohe Temperaturen (30°/24°C) zeigten bei den durchgeführten Versuchen keine Beeinträchtigung der Fertilität der fertilen und restorierten Genotypen.

Neben der Temperatur können aber auch Variationen anderer Umweltfaktoren bei einigen GMS-Systemen genutzt werden. Beim Reis existiert ein weiteres GMS-System, das sensitiv auf eine Veränderung der Photoperiode reagiert. Mit Hilfe dieser Eigenschaft ist es möglich, die im Kurztag induzierte Fertilität für Selbstungen zu nutzen, während die gleiche Linie im Langtag aufgrund der männlichen Sterilität als Saatgutelter für die Hybridsaatgutproduktion genutzt werden kann (SHI 1981 in YUAN et al. 1993). In China wird mit diesem System bereits Hybridreis gezüchtet und erwartet, daß die Nutzung weiter zunehmen wird (ZHANG et al. 1994; HORNER und PALMER 1995). Eine praktische Bedeutung konnte dieses System erlangen, weil der Übergang vom vegetativen Wachstum in die generative Phase durch eine frühe photoperiodische Reaktion induziert wird, während die Pollenfertilität unter der Kontrolle einer später wirkenden photoperiodischen Reaktion steht (YUAN et al. 1993). Die ursprüngliche männlich sterile Mutante zeigte in Kreuzungen mit fertilen Pflanzen der gleichen Linie einen monogen rezessiven Erbgang, in Kreuzungen mit anderen Linien wurde nachgewiesen, daß ein zweiter Locus zur Erklärung der Vererbung angenommen werden muß. ZHANG et al. (1994) schließen daraus, daß in der ursprünglichen Linie der zweite Locus bereits rezessiv vorgelegen haben muß. Es gelang den Autoren, mit molekularen Markern zwei Loci zu kartieren, die die Ausprägung der photoperiodisch-sensitiven genischen männlichen Sterilität bedingen. Die Autoren diskutieren, daß der erste Locus die photoperiodische Reaktion kodiert, während der zweite Locus das Gen für männliche Sterilität repräsentiert. Die Tatsache daß in verschiedenen Linien unterschiedliche Temperatureinflüsse auf dieses System vorliegen, versuchen die Autoren wie folgt zu erklären: Es wäre möglich, daß sich der zweite Locus, also das Sterilitätsgen in verschiedenen Herkünften unterscheidet, oder verschiedene Allele eines Sterilitätsgens vorliegen. Diese Unterschiede bezüglich des zweiten Locus könnten auch verschiedene Temperaturreaktionen bedingen. Diese Annahmen werden dadurch gestützt, daß bei zwei verschiedenen Linien der zweite Locus einmal auf Chromosom 5 und einmal auf Chromosom 3 kartiert wurde. Die Autoren schließen aber nicht aus, daß auch zusätzliche modifizierende Gene die Temperaturreaktionen in diesem System erklären könnten.

Der Reiz von geänderten Umweltbedingungen führt in der Regel zu Veränderungen im Phytohormonhaushalt der Pflanzen. Nahezu alle dieser Wachstumsregulatoren, Cytokinine, Gibberelline, Auxine, Ethylen und Abscisinsäure, wurden mit abnormaler Stamen- und Pollenentwicklung in Verbindung gebracht, vielleicht nicht zuletzt deshalb, weil sich diese Stoffe auch gegenseitig beeinflussen können (KAUL 1988; SAWHNEY und SHULKA 1994). Aus diesem Grund könnte versucht werden, die GMS-Pflanzen der *wi*- und *stl*-Sterilität mit Wachstumsregulatoren zu behandeln, um eine eventuelle Förderung der Fertilität hervorzurufen. Neben den Phytohormonen selbst können dabei auch Substanzen getestet werden, die die Synthese bestimmter Phytohormone hemmen oder ihre Rezeptoren blockieren. Bei der Tomate wurde eine GMS nachgewiesen, bei der mit Hilfe von Silbernitrat die Fertilität gefördert werden kann (TODOROV und TORDANOV 1984). Silberionen blockieren Rezeptoren für Ethylen, so daß bei der GMS wahrscheinlich ein Ethylenüberschuß vorliegt. Während appliziertes Ethylen bei einer Reihe von Pflanzenarten die Repression der männlichen Organe bei gleichzeitiger Förderung der Weiblichkeit bewirkt, werden Silbernitratbehandlungen unter anderem auch bei rein weiblichen Gurkenlinien zur Induktion männlicher Blüten eingesetzt, um diese Linien durch Selbstung erhalten zu können (GALUN 1961; TATLIOGLU 1993). Neben der Bedeutung für die praktische Pflanzenzüchtung haben die Applikationsversuche von Chemikalien besonders bei der Gurke zur Erstellung von Modellen beigetragen, die eine Erklärung der Geschlechtsausprägung ermöglichen (ATSMON und TABBAK 1979; YIN und QUINN 1995). Für einen solchen Ansatz, mit dem vielleicht auch die Interaktionen von Kerngenom und Mitochondrien in CMS- und GMS- Systemen aufgeklärt werden könnten, sprechen auch die folgenden Beobachtungen: Bei einer *Arabidopsis*-Mutante, der die Adenin-Phosphoribosyl-Transferase (APRT) fehlt, wurde neben einem geringfügig langsameren Wachstum als phänotypisches Hauptmerkmal der Abbruch der Mikrosporogenese nach der Meiose festgestellt. In den fertilen Wildtypen wird das Enzym in allen Organen der Pflanze exprimiert und ist eine Komponente des Purin-Nukleotid Stoffwechsels. In den Mutanten kommt es zu einer Anreicherung von Adenin, da dieses nicht zu Adenosin-Monophosphat umgewandelt wird. Weiterhin unterbleibt die Phosphorylosylation von Cytokinin-Basen in ihre Nukleotidform, was zu einer Verschiebung des aktiven Cytokinin-Gehalts in der Pflanze führen könnte (MOFFATT und SOMERVILLE 1988). In diesem Beispiel ist also ein Gen eines Stoffwechselweges bekannt, das sowohl den Energie- als auch den Phytohormonhaushalt der Zellen beeinflußt und dessen Mutation zu männlicher Sterilität führt. Bei einer GMS-Form von Raps wurden ebenfalls Veränderungen im Cytokinin-Metabolismus durch unterschiedliche Aktivitäten der Schlüsselenzyme (Adenin-Phosphoribosyl-Transferase und der Cytokinin-Oxidase) nachgewiesen (SHUKLA und SAWHNEY 1997). In diesem Zusammenhang ist besonders interessant, daß auch bei der Restoration der CMS der Gerste Cytokinine involviert sind (AHOKAS 1982). Aus diesem Grund sollten in zukünftigen Applikationsversuchen beim Schnittlauch neben den

GMS-Systemen auch die CMS-Systeme berücksichtigt werden, um die molekularen Grundlagen besser zu verstehen und um der Pflanzenzüchtung noch bessere Möglichkeiten bei der Nutzung dieser Systeme zu eröffnen.

Theoretisch wäre es möglich, bei dem in der Züchtung bereits genutzten CMS-System mit Hilfe hoher Temperaturen bei Temperatur-sensitiven Pflanzen oder mittels der Applikation von Tetracyclin bei Tetracyclin-sensitiven Pflanzen eine direkte Selbstung der A-Linie vorzunehmen (TATLIOGLU 1987; TATLIOGLU und WRICKE 1988). Allerdings birgt die Temperatursensitivität die Gefahr, daß in warmen Jahren auch bei der Hybridsaatgutproduktion Pollen in der A-Linie gebildet wird, und die Sorte durch Sibs verunreinigt wird. Aus diesem Grund scheint die Nutzung der Temperatursensitivität für die praktische Züchtung nicht geeignet zu sein. Auch die großflächige Applikation von Tetracyclin ist aus medizinischen Gründen nicht praktikabel, da das Versprühen von Antibiotika einen Selektionsdruck erzeugt, der die Vermehrung resistenter Bakterien begünstigen würde. In der Schnittlauchzüchtung hat sich folglich die Erhaltung der A-Linie mit Maintainern bewährt. Allerdings ist bei deren Selektion darauf zu achten, daß sie nicht das Temperatur-sensitive Restorer-gen enthalten, so daß die stabile Ausprägung der CMS auch in wärmeren Jahren gewährleistet ist. Die Tatsache, daß die Temperaturreaktion nur durch ein Gen bedingt wird, ermöglicht beim Schnittlauch die gezielte Eliminierung dieser unerwünschten Eigenschaft, während dies bei CMS-Systemen anderer Pflanzenarten aufgrund der ungeklärten Vererbung nicht möglich ist (TATLIOGLU 1996). Dies gilt vor allem für die CMS-Systeme 'Polima' und 'Napus' beim Raps (FAN und STEFANSSON 1986).

Die gezielte Beeinflussung einer CMS zur direkten Erhaltung der A-Linie wurde beim Weizen beschrieben. Dabei sollen photoperiodische Effekte auf die CMS mit dem Cytoplasma aus *Aegilops crassa* zur Erhaltung der männlich sterilen Linie genutzt werden. Unter Langtag-Bedingungen sind die Linien steril, während unter Kurztag-Bedingungen eine Selbstung aufgrund der Pollenentwicklung möglich ist (MURAI 1997).

Dieser Überblick zeigt, daß es bis heute nur in einigen wenigen Fällen gelungen ist, die Variabilität in der Sterilitätsausprägung bei GMS- und CMS-Systemen zu nutzen. Bei der größeren Zahl ist die Instabilität, insbesondere wenn sie durch einen Umweltfaktor wie der Temperatur hervorgerufen wird, eher nachteilig, da diese Einflußfaktoren nur bedingt zu regulieren sind.

5.4.2 Nutzungsmöglichkeiten stabiler CMS- und GMS-Systeme

Vegetativ zu vermehrende und perennierfähige Pflanzenarten wie der Schnittlauch bieten im Vergleich zu einjährigen Arten besondere Chancen für die Nutzung der GMS, da die sterilen Genotypen erhalten und vermehrt werden können. Die GMS-Formen *Wi/wi* und *StI/stI* können durch Bestäubung einer rezessiven sterilen Pflanze durch einen

heterozygoten Genotyp erhalten werden. Dazu sind die fertilen Pflanzen, die zu 50% in der Nachkommenschaft auftreten, auszumerzen, während die sterilen Pflanzen vegetativ vermehrt bzw. erhalten werden.

Werden beide Sterilitäten gleichzeitig genutzt, erhöht sich der Anteil der sterilen Pflanzen nach Kreuzung einer doppelt rezessiven, also sterilen Pflanze mit einem doppelt heterozygoten Genotyp auf 75%. Lassen sich die doppelt rezessiven von den übrigen sterilen Pflanzen phänotypisch unterscheiden, ist die Etablierung eines solchen Systems durch Nutzung der generativen und vegetativen Vermehrung möglich (Abb. 5.1).

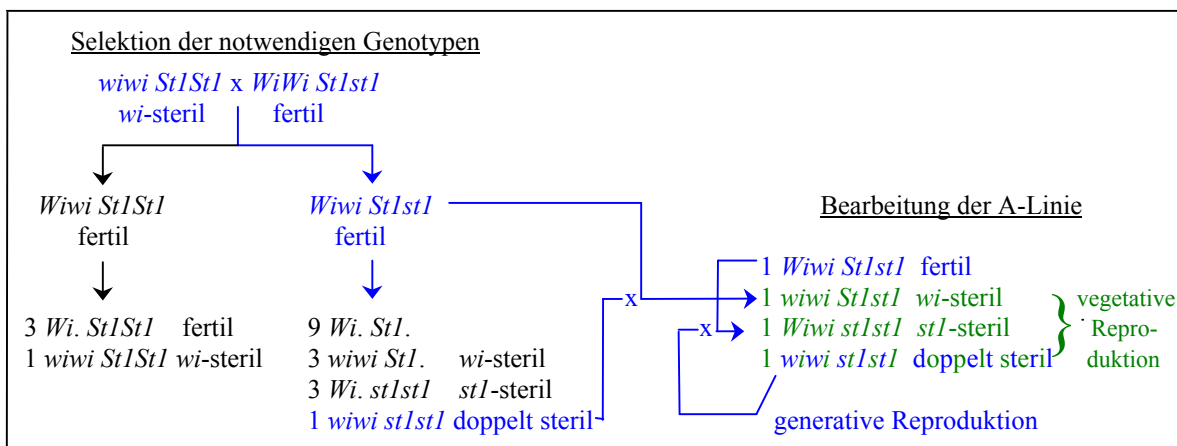


Abb. 5.1: Herstellung einer männlich sterilen Linie durch Nutzung zweier rezessiv vererbter Gene und vegetativer Vermehrung der sterilen Pflanzen am Beispiel der *wi*- und *st1*-GMS beim Schnittlauch.

Im linken Teil der Abbildung ist die Selektion der doppelt heterozygoten und doppelt rezessiven Genotypen dargestellt, die zum Aufbau der A-Linie notwendig sind. Die zu selektierenden Genotypen sind blau unterlegt. Die A-Linie kann dann generativ reproduziert werden, indem die entsprechenden Genotypen miteinander gekreuzt werden. Die für die Hybridsaatgutproduktion vegetativ zu erhaltenden bzw. zu vermehrenden sterilen Genotypen sind grün unterlegt. Da die doppelt rezessiven Genotypen sowohl zur vegetativen als auch zur generativen Reproduktion eingesetzt werden können, sind sie zweifarbig dargestellt.

Im Vergleich zur Verwendung nur eines GMS-Gens ist ein höherer Aufwand zur Selektion der Genotypen vor der generativen Reproduzierbarkeit der A-Linie notwendig. Dies wird jedoch durch den geringeren Anteil auszumerzender fertiler Pflanzen in dieser Linie gerechtfertigt. Bei der Nachkommenschaft können 75% der Pflanzen für die Hybridsaatgutproduktion verwendet werden, in der Abbildung 5.1 grün unterlegt, während dies bei der Nutzung nur eines Sterilitätsgens 50% sind. Die fertilen Pflanzen dieser Nachkommenschaft sind doppelt heterozygote Genotypen und können mit den doppelt sterilen Genotypen der gleichen Nachkommenschaft zur generativen Erhaltung und Vermehrung der Linie genutzt werden. Ein solches Kreuzungsmodell ist nur dann praktikabel, wenn die doppelt rezessiven Genotypen phänotypisch von den einfach rezessiven zu unterscheiden und dadurch leicht selektierbar sind. Ob diese Voraussetzung bei den Genen *Wi/wi* und *St1/st1* erfüllt ist, muß durch die Herstellung entsprechender Genotypen noch geklärt werden. Die Selektion ist leicht durchführbar, wenn das Saatgut in Quickpottplatten ausgelegt oder nach der Keimung in diese pikiert wird. Die Pflanzen können dann im ersten Jahr im Freiland heranwachsen bis im Herbst die Ruheinduktion erfolgt.

Zur Vermeidung von Arbeitsspitzen können die Pflanzen schon frühzeitig im Gewächshaus angetrieben werden, so daß die Selektionsarbeiten bis zum Frühjahr bereits abgeschlossen sind. Dabei können die doppelt rezessiven Genotypen in der Linie zur Hybridsaatgutproduktion belassen werden oder für die generative Vermehrung selektiert werden. Nach dem Auspendeln in das Freiland kann im folgenden Jahr Hybridsaatgut geerntet werden. Beim Schnittlauch erscheint ein solcher Weg zur Hybridsaatgutproduktion durchaus möglich zu sein, allerdings ist die Nutzung der vorhandenen CMS-Systeme bei dieser Pflanzenart einfacher. Für andere vegetativ vermehrbare und perennierende Arten, bei denen kein CMS-System existiert, stellt ein solches System eine Möglichkeit der Hybridsaatgutproduktion dar. Insbesondere für andere Gewürz- und Heilkräuter, die oftmals nur wenig züchterisch bearbeitet sind und in der Regel sehr heterogene Bestände bilden, verspricht die Züchtung von Hybriden große Erfolgchancen, zumal aufgrund der genetischen Diversität hohe Heterosiseffekte nutzbar sein sollten.

Für Pflanzenarten, die nicht perennierend sind, ist die Nutzung der GMS ungleich schwieriger. Bei einigen *Allium*-Arten kann eine vegetative Vermehrung über Brutzwiebeln erfolgen, die in der Dolde gebildet werden. Dies wurde für die Erhaltung einer GMS-Linie beim Porree beschrieben, um diese Linie zur Hybridsaatgutproduktion einzusetzen, da beim Porree kein CMS-System existiert (SMITH 1993). Die Züchtung von Hybriden ist auch bei dieser Pflanzenart sehr erwünscht. Wie beim Schnittlauch und der Zwiebel findet durch Protandrie in frei abblühenden Beständen zwar hauptsächlich Fremdbefruchtung statt, die Vielzahl der Einzelblüten pro Dolde - und beim Schnittlauch die Zahl der Dolden pro Pflanze - führen aber zu etwa 20% Selbstungsansatz (BREWSTER 1994). Die daraus heranwachsenden Pflanzen zeigen Inzuchtdepression, so daß in den Beständen eine starke Variabilität entsteht. So konnte die Variabilität im Pflanzengewicht bei dem Hybridporree im Vergleich zu herkömmlichen Sorten um die Hälfte reduziert werden, da keine schwachwüchsigen Sibs vorhanden sind (SMITH 1993). In offen bestäubten Sorten kann die Auskreuzungsrate durch die Einkreuzung von GMS-Genen erhöht werden, so daß der Anteil inzuchtgeschwächter Pflanzen in den Sorten abnimmt.

Ist eine vegetative Vermehrung nicht durchführbar, müssen die sterilen Pflanzen ständig neu selektiert werden. Dabei können Marker hilfreich sein. Allerdings sind molekulare Marker zu aufwendig und kostenintensiv, um sie in großen Beständen zur Selektion der sterilen Pflanzen einzusetzen. Außerdem darf zwischen dem Markerlocus und dem Sterilitätslocus kaum Austausch erfolgen, da bereits einige wenige fertile Pflanzen in der A-Linie zu einer starken Verunreinigung der Hybridsorte mit Sibs führen können. Aus diesen Gründen haben Marker bis heute nur eine geringe Bedeutung bei der praktischen Züchtung der A-Linien erlangt, obwohl bereits 1930 von SINGLETON und JONES die Nutzung eines Kornfarbstoff-Markers zur Züchtung männlich steriler Linien beim Mais vorgeschlagen wurde. Es gibt aber auch einige wenige Beispiele, bei denen Marker erfolg-

reich zur Selektion der sterilen Pflanzen in der A-Linie genutzt werden. Die Nutzung pleiotroper Effekte und eng gekoppelter Marker verspricht jedoch nur dann Erfolg, wenn das Markermerkmal früh zu bonitieren ist. Geeignet sind Merkmale, die den Saatcharakter betreffen oder im Sämlingsstadium zu erkennen sind. Insbesondere wenn durch das Sterilitätsgen früh erkennbare pleiotrope Effekte hervorgerufen werden, können diese als Marker genutzt werden, da bei pleiotropen Effekten im Gegensatz zu gekoppelten Markern das Problem der Rekombination entfällt. Bei *Capsicum* verursacht ein Sterilitätsgen einen pleiotropen Effekt in Form eines starken vegetativen Wachstums der Sämlinge, so daß die sterilen von den normal wachsenden fertilen Pflanzen unterschieden werden können (MESHAM und NARKHEDE 1982). Ein anderes Beispiel für die pleiotrope Wirkung eines Sterilitätsgens sind glatte, unbehaarte Blätter bei *Citrullus* (LOVE et al. 1986). Beim Mais können Gene der Endosperm- und Aleuronfarbe als Marker genutzt werden (GALINAT 1976). Die Sortierung des Saatguts kann mit einer dafür entwickelten Maschine erfolgen (GALINAT 1983). Andere Beispiele für früh selektierbare Marker sind bei Soja die Ausprägung der Hypokotylfarbe (LEWERS et al. 1996) und bei der Tomate die Blattform (WOLLARD et al. 1985). Später bonitierbare Marker für Sterilitätsgene wurden ebenfalls beschrieben, werden aber in der Züchtung nicht genutzt, da die Aufzucht der fertilen Pflanzen zu aufwendig ist, oder deren Ausmerzung nicht mehr rechtzeitig vor der Blüte erfolgen kann (RAO et al. 1990).

Bei allen den bisher genannten Beispielen ist neben der Ausmerzung der fertilen Pflanzen aus der A-Linie darauf zu achten, daß zu ihrer Erhaltung das Saatgut nur von sterilen Pflanzen geerntet wird, um das Verhältnis von 50% heterozygoten und 50% rezessiven Genotypen dauerhaft zu erhalten. Bei Selbstungen der heterozygoten Genotypen treten in der Nachkommenschaft zu einem Viertel dominante Genotypen auf, die nicht von den heterozygoten zu unterscheiden sind. Ausgehend von der Selbstung einer heterozygoten Pflanze kann das bestmögliche Spaltungsverhältnis von 50% sterilen und 50% fertilen Pflanzen in 3 Generationen erreicht werden, wenn das Saatgut ausschließlich auf den sterilen Pflanzen geerntet wird.

Bei der Gerste wurde eine Kopplungsgruppe aus einem Sterilitätsgen und zwei weiteren Merkmalen beschrieben, die es ermöglicht, die A-Linie durch Selbstung der heterozygoten und Ausmerzung der herauspaltenden dominanten Genotypen zu erhalten (Abb. 5.2; FALK und KASHA 1982). Ein zusätzlicher Marker liegt in der A-Linie rezessiv vor und bedingt orange Deckspelzen, Gen *O/o*. Dies dient zur Kontrolle, daß die A-Linie als Inzuchtlinie erhalten bleibt und nicht durch Fremdeinstäubung verunreinigt wird. Mit dem Sterilitätsgen *Msg6/msg6* ist ein Gen gekoppelt, das schrumpelige Körner bedingt, *Sex1/sex1*. Die rezessiven Genotypen haben also diesen Korncharakter und sind männlich steril, während die heterozygoten fertilen Genotypen durch glatte Körner gekennzeichnet sind. Die letzteren dienen zur Erhaltung der A-Linie, indem Selbstungen durchgeführt werden.

Dabei treten in der Nachkommenschaft auch die unerwünschten homozygot dominanten Pflanzen auf. Für die Erhaltung der A-Linie müssen diese Genotypen ausgemerzt werden, so daß nur heterozygote Genotypen zur Vermehrung kommen. Um dies zu erreichen, wird ein Bestockungs-Merkmal *Uc2/uc2* genutzt, das in Repulsionskopplung zu den übrigen Genen vorliegt. Heterozygote Genotypen zeigen eine starke Bestockung, während die unerwünschten homozygoten Genotypen einhalmig sind und folglich ausgemerzt werden können. Bei der Hybridsaatgutproduktion wird als paternaler Elter der Hybride ein glattkörniger Genotyp verwendet, so daß auch das Hybridsaatgut glattkörnig ist. Findet in der A-Linie zwischen dem Sterilitätsgen und dem Gen für den Korncharakter Rekombination statt, so werden aus schrumpeligen Samen der A-Linie fertile Pflanzen gebildet, die bei der Hybridsaatgutproduktion zu Sibs führen können. Dieser Selbstungsansatz ist jedoch im Gegensatz zum Hybridsaatgut schrumpelig und kann folglich aussortiert werden. Die Genotypen und die jeweils zu selektierenden phänotypischen Eigenschaften sind in Abbildung 5.2 zusammengefaßt.

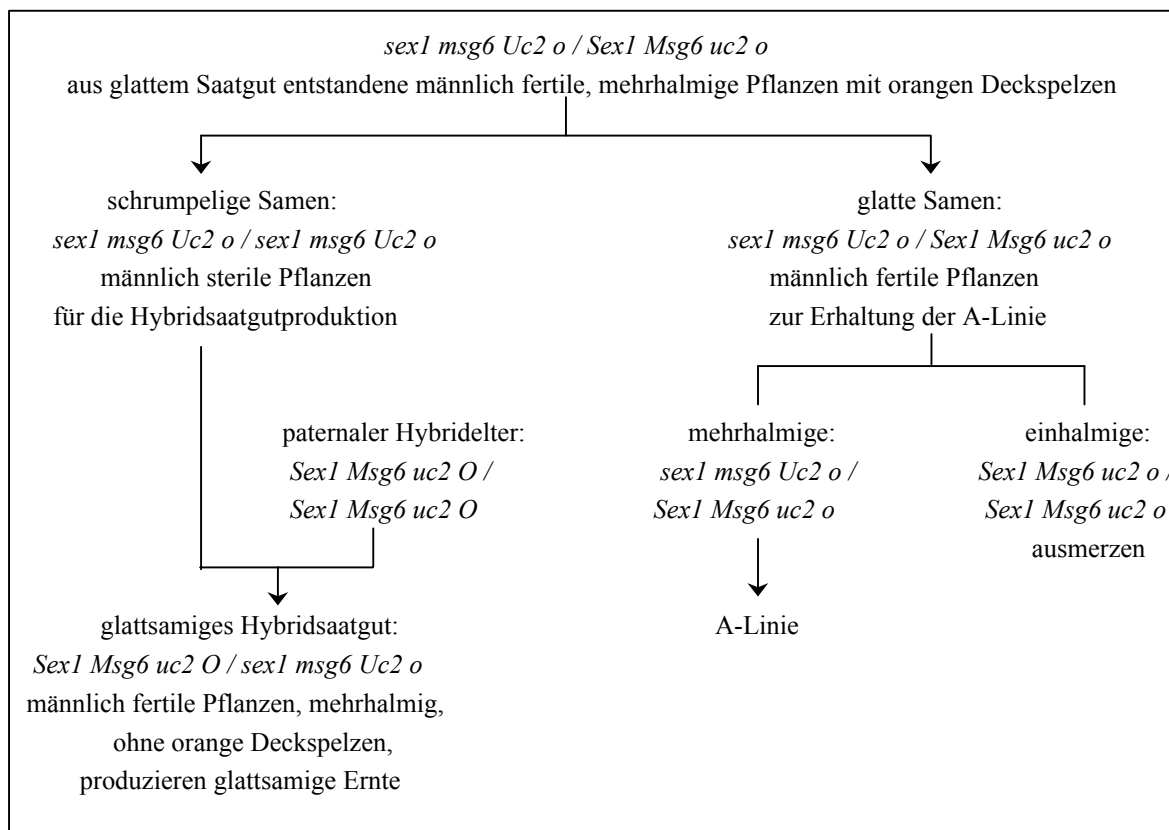


Abb. 5.2: Erhaltung einer sterilen Linie durch Selbstung heterozygoter Pflanzen und markergestützte Selektion am Beispiel des *msg6*-Gens bei der Gerste (nach FALK und KASHA 1982).

Kodominante Marker wie Isoenzyme oder verschiedene molekulare Marker können ebenfalls die Selektion aller drei Genotypen in den Selbstungsnachkommenschaften ermöglichen. Beispielsweise wurde bei der Tomate eine Kopplung des GMS-Gens *ms10* mit einem Peroxidase marker nachgewiesen (TANKSLEY et al. 1984). Wie bereits erwähnt

ist die Nutzung eines solchen Isoenzymmarkers jedoch für die ständig durchzuführende Selektionsarbeit sehr aufwendig.

Eine alternative Nutzung von Markern, um GMS in der Hybridzüchtung einzusetzen, besteht darin, die Marker nicht bei der Erstellung der A-Linie zur Unterscheidung steriler und fertiler Pflanzen zu verwenden, sondern mit ihrer Hilfe die Sibs in der Hybride zu entfernen. Ein solches System wurde bei der Wassermelone beschrieben, bei der mit Hilfe eines rezessiv vererbten Sämlingsmarkers die Sibs von den Hybriden unterschieden werden können (ZHANG et al. 1996). Die Voraussetzung ist, daß der Sämlingsmarker bei der A-Linie rezessiv vorliegt, bei dem paternalen Elter der Hybride dagegen dominant, so daß die Hybriden das Merkmal nicht ausbilden. Zur Vermeidung einer zu großen Zahl an Sibs sind die fertilen Pflanzen in der A-Linie trotzdem zu eliminieren. Sibs, die bereits vor der Ausmerzung der fertilen Pflanzen entstanden sind, können dann mit Hilfe des Markers aus der Hybride entfernt werden. Dieses Verfahren bietet sich für Pflanzenarten an, bei denen relativ wenige Pflanzen auf eine Flächeneinheit kommen, insbesondere dann, wenn zuvor eine Jungpflanzenkultur erfolgt, und somit die Selektion der Sibs vor dem Auspflanzen möglich ist. Bei Pflanzenarten, bei denen große Einzelpflanzenzahlen pro Flächeneinheit stehen, ist die Ausmerzung von Sibs in der Hybride dagegen sehr aufwendig.

Ein GMS-System, daß die Erhaltung einer Linie ermöglicht, die zu 100% aus männlich sterilen Pflanzen besteht, wurde beim Raps beschrieben. In diesem System liegt eine fertilitätsbedingende epistatische Wirkung des *Ms2/ms2*-Gens über das *Ms1/ms1*-Gen vor: Pflanzen mit dominanter oder heterozygoter Konstitution am *Ms2/ms2*-Locus sind fertil, unabhängig von der Konstitution am *Ms1/ms1*-Locus. Liegt das *Ms2/ms2*-Gen dagegen rezessiv vor und gleichzeitig mindestens ein dominantes Allel des *Ms1/ms1*-Gens, sind die Pflanzen steril (LI et al. 1998). Die zu kreuzenden Genotypen sind in Abbildung 5.3 zusammengefaßt.

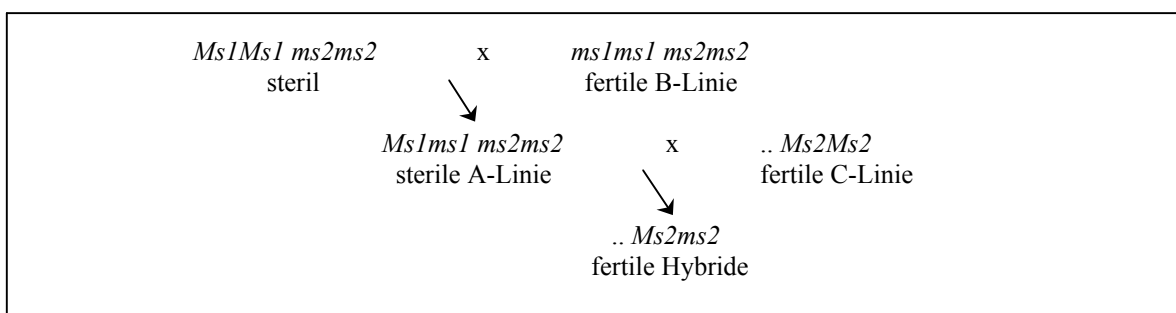


Abb. 5.3: Herstellung einer männlich sterilen Linie beim Raps durch Nutzung eines hypostatischen dominanten Gens (*Ms1*) und eines epistatischen rezessiven Gens (*ms2*), dessen dominantes Allel die Fertilität der Hybride bedingt (nach LI et al. 1998).

Das Problem der Aufspaltung steriler und fertiler Pflanzen in der A-Linie ist in diesem System eine Generation zurückverlegt, so daß sich die Anzahl auszumerzender Pflanzen reduziert. So kann bei der Hybridsaatgutproduktion mit einer sterilen Linie gearbeitet

werden, aber der zur Erzeugung der A-Linie notwendige Genotyp *Ms1Ms1 ms2ms2* kann nur durch Bestäubung mit einem Genotyp *Ms1Ms1 Ms2ms2* erhalten werden. Die in der Nachkommenschaft zu 50% auftretenden fertilen Pflanzen, *Ms1Ms1 Ms2ms2*, müssen ausgemerzt werden. Ein vergleichbares System wurde auch beim Chinakohl zur Erzeugung von Hybriden vorgeschlagen (HUI et al. 1995; ZHANG et al. 1995).

Die aufgeführten Beispiele zeigen, daß ein ökonomisch sinnvoller Einsatz von CMS-Systemen ohne die Möglichkeit einer zeitweisen Förderung der Fertilität zur Erhaltung einer sterilen Linie kaum möglich ist. Ausnahmen bilden lediglich solche Pflanzenarten, bei denen die A-Linie mehrjährig nutzbar ist, und dadurch der Aufwand der Selektionsarbeit gerechtfertigt wird, oder wenn mit relativ wenigen Pflanzen größere Saatgutmengen produziert werden können, und diese einen sehr hohen Preis erzielen.

CMS-Systeme bieten die wesentlich besseren Voraussetzungen zur Etablierung eines Hybridzuchtverfahrens, da es mit ihrer Hilfe möglich ist, Nachkommenschaften zu entwickeln, die zu 100% aus sterilen Pflanzen bestehen (vergl. Abb. 1.1). Allerdings muß dazu neben der sterilen A-Linie die Maintainerlinie erhalten werden, und die züchterische Bearbeitung muß über die Rückkreuzung mit der Maintainerlinie erfolgen. Der angestrebte hohe Homozygotiegrad in der A-Linie ist aufgrund der Rückkreuzungen nicht so schnell zu erreichen, wie in einer Linie, die durch Selbstung vermehrt werden kann. Dennoch werden mit steigender Tendenz CMS-Systeme in den verschiedensten Pflanzenarten genutzt, und mit ihrer Hilfe leistungsstarke Hybridsorten entwickelt.

Wie in der Einleitung zu diesem Kapitel bereits erwähnt wurde, kann die Festlegung auf ein Sterilitätscytoplasma negative Effekte auf agronomisch wichtige Merkmale hervorrufen. Aus diesem Grund ist der Nachweis eines neuen CMS-Systems beim Schnittlauch von unmittelbarer Bedeutung für die praktische Züchtung. Die Chancen, aus züchterisch interessanten Herkünften direkt Maintainer selektieren zu können, sind durch den Nachweis eines zweiten CMS-Systems vergrößert worden, wenn die rezessiven Allele des *X/x* und des *St2/st2*-Gens in diesen Herkünften vorkommen. Weiterhin zeigt das neue CMS-System nach den bisher durchgeführten Untersuchungen eine stabile Ausprägung der Sterilität über einen großen Temperaturbereich (20°/12°C – 30°/24°C). Dies kann bei der Suche nach neuen Maintainern bedeutsam sein, da bei dem alten CMS-System stets die Gefahr der Einkreuzung des Temperatur-sensitiven Restorergens besteht. Bleibt dies unerkannt, kann es in warmen Jahren zur Pollenproduktion und damit zur Befruchtung innerhalb der A-Linie kommen (TATLIOGLU 1987).

Besonders interessant erscheint die Beobachtung, daß in den untersuchten Linien, die das neue CMS-Plasma besitzen, der Blütezeitpunkt deutlich früher als bei den Vergleichslinien lag. Aufgrund der bisher durchgeführten Untersuchungen kann jedoch noch nicht endgültig ausgeschlossen werden, daß dieses Merkmal durch Kerngene bedingt wird, die zufällig in den Linien mit dem Cytoplasma (5) in anderer Form vorliegen könnten, als in den übrigen,

später blühenden Linien. Ob die schnellere Entwicklungsfähigkeit bzw. Frühzeitigkeit tatsächlich durch den Cytoplasmotyp bedingt wird, muß noch durch reziproke Kreuzungen mit später blühenden Genotypen verifiziert werden. Für die Erfassung solcher Merkmale, die durch den Cytoplasmotyp bedingt werden, könnten auch Genotypen selektiert werden, die als Maintainer für beide CMS-Linien dienen. Nach einigen Rückkreuzungen mit diesen Maintainern würden nahe isogene Linien vorliegen, die sich bezüglich der beiden Sterilitätscytoplasmen bzw. dem Maintainercytoplasma unterscheiden. Effekte des jeweiligen Cytoplasmatyps könnten dann in dem gleichen Kernhintergrund verglichen werden. Neben anderen Merkmalen wird der Blütezeitpunkt auch beim Mais durch den Cytoplasmotyp beeinflusst (KHEHRA und BHALLA 1976; RAO und FLEMMING 1978). Auch diese Autoren stellten die Bedeutung für die Züchtung früher Sorten heraus.

Ein weiterer interessanter Aspekt des neuen CMS-Systems besteht darin, daß es sich um einen funktionellen Schaden handelt, daß also Pollen gebildet, aber nicht ausgeschüttet werden (vergl. Kapitel 2). Es ist eventuell möglich, durch Öffnen der Antheren Selbstungen der CMS-Pflanzen vorzunehmen. Ein derartiges Vorgehen wurde bei genisch männlich sterilen Tomaten mit vergleichbarem Phänotyp beschrieben (ROEVER 1948). Die dazu notwendige Arbeit ist verglichen mit einer Kastration zwar gering (RAO et al. 1990), aber die Möglichkeit der Erhaltung der neuen CMS beim Schnittlauch mit den selektierten Maintainern erscheint ökonomisch günstiger zu sein. Zudem ist auch noch nicht geklärt, ob die Pollen der CMS-Pflanzen wirklich befruchtungsfähig sind.

6 Der Einfluß von Kerngenen auf die mitochondriale Genomorganisation und die Konstanz der maternalen Vererbung des Cytoplasmas

6.1 Einleitung

Zur Erklärung der uniparentalen maternalen Vererbung der Organellen wurden mehrere Modelle aufgrund der Untersuchungen an verschiedenen Pflanzenarten entwickelt. Diese lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Degeneration der Organellen oder Elimination des Cytoplasmas während der Mikrosporenenreifung
- Ausschluß der Organellen von der generativen Zelle oder den Spermazellen während der ersten oder zweiten Pollenmitose
- Degeneration der Organellen während der Entwicklung der generativen oder Spermazelle
- Organellenausschluß während der Gametenfusion
- Degeneration, fehlende Replikation oder Kompartimentierung in den Suspensorzellen nach der Zygotenbildung

Elektronenmikroskopische Untersuchungen z.B. an *Hosta* (VAUGHN et al. 1980) haben ergeben, daß bei dieser Pflanzenart die Pollenmutterzellen und einkernige Pollen große Plastiden enthalten, während kurz vor und nach der Meiose nur noch Reste der Plastiden oder gar keine mehr vorhanden sind. Hier erfolgt also eine Degeneration während der Mikrosporogenese. Die Mitochondrien lagern sich hingegen zu Aggregaten zusammen, die noch in der vegetativen und generativen Zelle des keimenden Pollens gefunden wurden.

Das zweite Modell, bei dem ein physikalischer Ausschluß der Organellen von der generativen Zelle aufgrund einer polarisierten Anordnung der Organellen und der inaequalen Teilung während der ersten Pollenmitose erfolgen soll, scheint bei einigen Arten der Orchideaceae verwirklicht zu sein, da die generativen Zellen weder Mitochondrien noch Chloroplasten enthalten (YU und RUSSELL 1992).

In der Regel reichen diese Modelle zur Erklärung der maternalen Vererbung jedoch nicht aus, da sogar nach der zweiten Pollenmitose noch Organellen in den entstehenden Spermazellen nachgewiesen werden. Insbesondere das Vorkommen von Mitochondrien in den generativen und Spermazellen scheint nahezu universell zu sein (CORRIVEAU und COLEMAN 1988; HAGEMANN und SCHRÖDER 1989), doch auch Chloroplasten wurden bei verschiedenen Pflanzenarten, insbesondere bei niederen Pflanzen und Algen während

dieses Entwicklungsstadiums gefunden, selbst dann, wenn eine maternale Vererbung der Organellen nachgewiesen wurde (CONNETT 1987). Ein Modell zur Degeneration der Organellen während der Entwicklung der generativen Zelle oder der Spermazellen durch eine autophagozytose Vakuolenbildung wurde von YU und RUSSELL (1994) beschrieben. Die Organellen werden dabei von einer vom Endoplasmatischen Reticulum gebildeten Membran umschlossen. An das dadurch gebildete Autophagosom schließen sich lysosomale Vesikel an, deren hydrolytische Enzyme die eingeschlossenen Organellen auflösen. Dabei können die Mitochondrien aufgrund ihrer höheren Replikationszahl erhalten bleiben, so die Autoren.

Ein Ausschluß der Organellen während der Spermazellenreifung oder der Gametenfusion (viertes Modell) durch Abschnürung von Teilen des Cytoplasmas, wurde unter anderem bei der Gerste (MOGENSEN und RUSCHE 1985) beschrieben: In der unmittelbarer Nähe zu befruchteten Eizellen wurden kernfreie "cytoplasmic bodies" nachgewiesen, die sowohl Mitochondrien als auch Chloroplasten enthalten und als das männliche Cytoplasma interpretiert werden, das während der Fusion von Ei- und Spermazelle von der entstehenden Zygote ausgeschlossen wird (MOGENSEN 1988). Ähnliche Strukturen waren bereits 1968 von JENSEN und FISHER bei der Baumwolle beschrieben worden.

Auch wenn Organellen von der Spermazelle in die Zygote gelangen, weisen die daraus entstehenden Pflanzen oftmals nur die maternalen Organellen auf, während die paternalen verloren gehen. Dies kann dadurch bedingt sein, daß die DNA der paternalen Organellen während der Bildung der generativen oder der Spermazellen deletiert wurde. Als ein Hinweis auf solche Prozesse kann die Tatsache gewertet werden, daß Pflanzen, die aus Pollen regeneriert wurden, oftmals Albinismus zeigen, und der Anteil dieser Mutanten mit dem Reifegrad des Pollens zunimmt (MOGENSEN 1996). MIYAMURA et al. (1987) sowie CORRIVEAU und COLEMAN (1988) konnten mittels DAPI-Färbung (DNA fluorochrome 4', 6-diamino-2-phenyl-indole) bei verschiedenen Pflanzen das Verschwinden der Organellen-DNA während der Pollenreifung nachweisen. Verantwortlich für diesen Abbau der Organellen-DNA scheinen pollenspezifische Nukleasen zu sein. Diese wurden zuerst bei der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* nachgewiesen (OGAWA und KUROIWA 1985), später auch in höheren Pflanzen mit maternaler Organellenvererbung, während sie bei Pflanzen mit biparentaler Chloroplastenvererbung fehlen (NAKAMURA et al. 1987; NAKAMURA et al. 1992; SODMERGEN et al. 1992).

In der Literatur finden sich jedoch mehrere Beispiele, bei denen Abweichungen vom maternalen Erbgang des Cytoplasmas beobachtet wurden. Insbesondere bei den Plastiden wird bei etwa einem Drittel der untersuchten Arten eine mindestens teilweise biparentale Vererbung festgestellt (SMITH 1989). Bei *Pelargonium* wurde diese schon 1909 von BAUR beschrieben und durch spätere klassisch genetische Analysen (TILNEY-BASSET 1973, 1974 TILNEY-BASSET et al. 1992) und cytologische Untersuchungen (GUO und HU 1995)

bestätigt. Auch in anderen Arten wie beispielsweise *Nicotiana* (MEDGYESY et al. 1986), *Medicago* (SCHUMANN und HANCOCK 1989; SMITH 1989; MASOUD et al. 1990; FORSTHOEFEL et al. 1992) und *Coreopsis* (Asteraceae, MASON et al. 1994) wurde eine biparentale Vererbung der Plastiden nachgewiesen. Cytologische Hinweise auf eine Transmission der Plastiden über den Pollen in die Zygote wurden mittels der DAPI-Färbung in einer Reihe weiterer Pflanzenarten gefunden (CORRIVEAU und COLEMAN 1988). Allerdings gibt diese Nachweismethode noch keinen Aufschluß darüber, ob die paternalen Plastiden in dem neuen Organismus erhalten bleiben oder aussortiert werden. Neben biparentaler wurde auch strikte paternale Vererbung der Plastiden nachgewiesen. Letzteres scheint die Regel bei Koniferen (Gymnospermen) zu sein (zusammengefaßt in MOGENSEN 1996).

Bezüglich der Vererbung der Mitochondrien war aufgrund der fehlenden phänotypischen Marker im Vergleich zur Chloroplastenvererbung lange Zeit wenig bekannt. Erst durch den Nachweis, daß CMS mitochondrial bedingt ist (phänotypischer Marker) und vor allem durch die Entwicklung der RFLP-Technik konnte die Weitergabe dieser Organellen an ihre Nachkommen verfolgt werden. In den untersuchten Pflanzenarten ist die uniparentale maternale Vererbung der Mitochondrien die Regel, Ausnahmen gibt es, verglichen mit der Häufigkeit solcher Abweichungen bei den Chloroplasten, nur wenige. Eine Gruppe von Gymnospermen-Arten, bei denen die Mitochondrien vorwiegend paternal vererbt werden, sind die Koniferen mit Ausnahme der Pinaceae und Taxaceae (zusammengefaßt in MOGENSEN 1996). Bei den Angiospermen wurde eine solche Gruppe von Pflanzen nicht nachgewiesen, obwohl die Mitochondrien in der Regel in den generativen Zellen und Spermazellen enthalten sind (CORRIVEAU und COLEMAN 1988; HAGEMANN und SCHRÖDER 1989) und folglich bis zur Zygote gelangen. Ihr Ausschluß erfolgt also erst bei der Befruchtung oder in der Zygote. Die früher greifenden Ausschlußmechanismen (1-3 in der Aufzählung am Anfang dieses Kapitels) scheinen folglich für die Vererbung der Mitochondrien von untergeordneter Bedeutung zu sein. Die Frage, warum die maternale Vererbung der Mitochondrien dennoch eine höhere Stabilität als die der Plastiden zeigt, soll in diesem Kapitel diskutiert werden.

Bei den Spaltungsanalysen in Kapitel 4 wurde eine konstante maternale Vererbung der verschiedenen Cytoplasmatypen vorausgesetzt. Diese Annahme wird im folgenden durch Southern-Hybridisierungen mit mitochondrialen Gensonden überprüft, da bei *Allium*-Arten eine Analyse der mitochondrialen Vererbung bisher nicht durchgeführt wurde, und sich die in Kapitel 4 beschriebenen Nachkommenschaften zur Bearbeitung dieser Fragestellung besonders gut eignen. Dabei werden die kerngenetischen Sterilitätsfaktoren berücksichtigt, um einen eventuellen Einfluß von GMS- beziehungsweise Restorer genen auf die mitochondriale Genomorganisation feststellen zu können.

6.2 Material und Methoden

6.2.1 Pflanzenmaterial

Das Pflanzenmaterial stammt aus den in Kapitel 4 erläuterten Kreuzungen. Dabei wurden jeweils zwei Pflanzen mit verschiedenen Cytoplasmatypen gekreuzt. In der F₂-Generation spaltet jeweils einer der kerngenetischen Sterilitätsfaktoren *Wi/wi*, *St1/st1* oder *St2/st2*. Die untersuchten Pflanzen sind in Tabelle 6.1 zusammengefaßt.

Tabelle 6.1: Pflanzenmaterial zur Untersuchung der Konstanz der maternalen Vererbung der Mitochondrien unter Berücksichtigung der kerngenetischen Sterilitätsfaktoren *Wi/wi*, *St1/st1* bzw. *St2/st2*

Konstitution des kerngenetischen Sterilitätsfaktors	Kreuzung der Cytoplasmatypen		
	(1) und (2)	(1) und (3)	(1) und (5)
<i>Wi/wi</i>			
maternaler Elter: <i>Wi Wi</i>	9043/3	2035/1	2023/14
paternaler Elter: <i>Wi Wi</i>	8015/72	8015/65	8015/65
F ₁ <i>Wi wi</i>	10022/3	14001/12	13006/7
F ₂ <i>wi wi</i> (steril)	11038/22	15070/1	15004/1
	/40	/20	/4
	/68	/26	/6
<i>Wi</i> . (fertil)	/1	/3	/2
	/2	/4	/7
	/8	/11	/8
<i>St1/st1</i>	(2) und (1)	(2) und (3)	(2) und (5)
maternaler Elter: <i>St1 St1</i>	Gr. 9	2035/1	2023/14
paternaler Elter: <i>St1 st1</i>	9002/4	9001/11	9001/11
F ₁ <i>St1 st1</i>	13012/3	14002/7	13013/10
F ₂ <i>st1 st1</i> (steril)	15021/11	15080/2	15037/7
	15022/5	/4	/14
	/7	/5	/19
<i>St1</i> . (fertil)	15021/6	/1	/11
	/9	/9	/16
	/12	/15	/28
<i>St2/st2</i>	(5) und (1)		
maternaler Elter: <i>St2 St2</i>	Gr. 9		
paternaler Elter: <i>St2 st2</i>	9046/6		
F ₁ <i>St2 st2</i>	13023/5		
F ₂ fertil ^a	15051/4		
	/7		
	/9		
	/10		
	/17		
	/20		

^a) da das *st2*-Gen die Sterilität im Cytoplasma (1) nicht ausprägen kann, war eine Unterscheidung der rezessiven und dominanten Genotypen zum Zeitpunkt der Durchführung der Untersuchungen nicht möglich.

6.2.2 Methoden

Die Isolierung der DNA, ihre Restriktion und Übertragung auf eine Trägermembran sowie die Southern-Hybridisierungen mit den mitochondrialen Gensonden erfolgte wie in den Abschnitten 3.2.2 – 3.2.5 beschrieben.

6.3 Ergebnisse

6.3.1 Konstanz der maternalen Vererbung der Mitochondrien in verschiedenen Kernhintergründen und unter Berücksichtigung der GMS-Gene *Wilwi* und *St1/st1* sowie des Restorergens *St2/st2*

In Abbildung 6.1 sind die Hybridisierungsmuster der Enzym/Sondenkombination *EcoRI/cob* der Parental-, F₁- und F₂-Generation nach Kreuzung der Cytoplasmatypen (2), (3) und (5) mit dem Cytoplasmatyp (1) unter Berücksichtigung des GMS-Gens *Wi/wi* dargestellt.

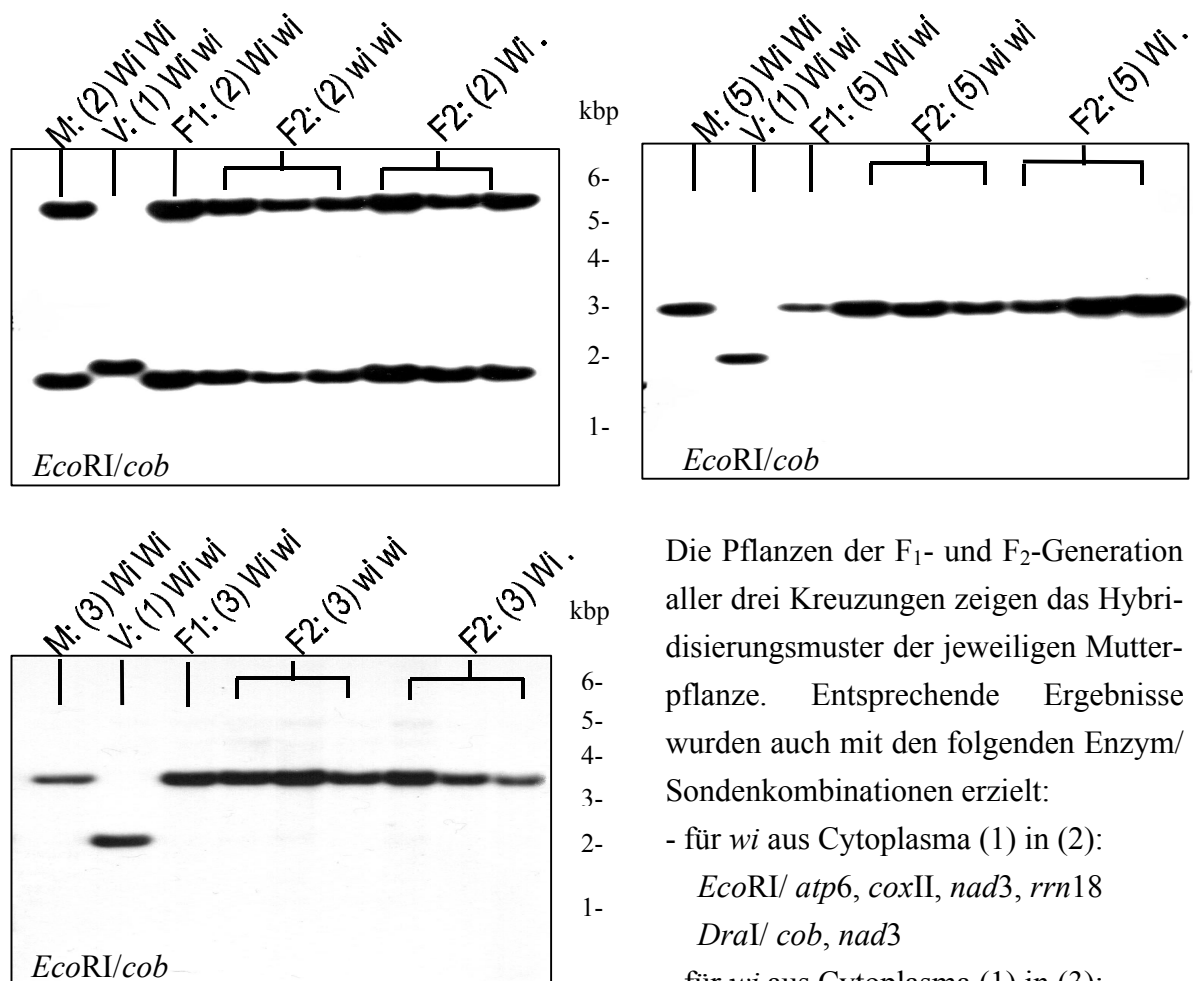


Abb. 6.1: Hybridisierungsmuster (*EcoRI/cob*) des maternalen (M) und paternalen Elters (V) sowie der Filialgeneration (F) 1 und 2 nach Einlagerung des *wi*-Gens aus dem Cytoplasma (1)

- links oben: in das Cytoplasma (2)
- rechts oben: in das Cytoplasma (5)
- unten: in das Cytoplasma (3).

Die Pflanzen der F₁- und F₂-Generation aller drei Kreuzungen zeigen das Hybridisierungsmuster der jeweiligen Mutterpflanze. Entsprechende Ergebnisse wurden auch mit den folgenden Enzym/Sondenkombinationen erzielt:

- für *wi* aus Cytoplasma (1) in (2):
EcoRI/ atp6, coxII, nad3, rrn18
DraI/ cob, nad3
- für *wi* aus Cytoplasma (1) in (3):
EcoRI/ atp6, atp9, coxII, rrn18
DraI/ atp6, cob, coxII.
- für *wi* aus Cytoplasma (1) in (5):
EcoRI/ atp6, coxII, nad3, rrn18
DraI/ cob, nad3.

In der Abbildung 6.2 sind die Hybridisierungsmuster der Enzym/Sondenkombination *EcoRI/cob* der Parental-, F₁- und F₂-Generation nach Kreuzung der Cytoplasmatypen (1), (3) und (5) mit dem Cytoplasmatyp (2) unter Berücksichtigung des *GMS*-Gens *St1/st1* dargestellt.

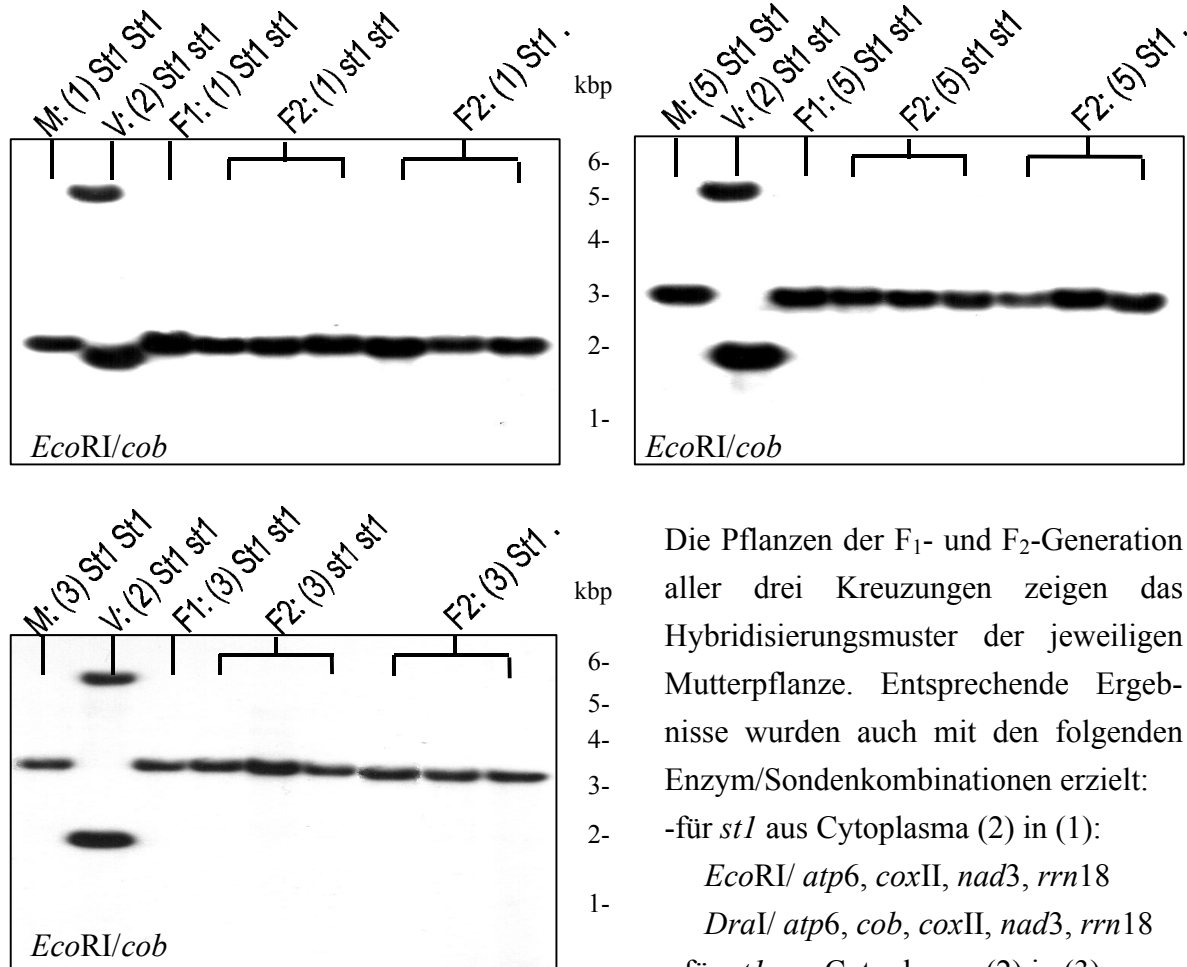


Abb. 6.2: Hybridisierungsmuster (*EcoRI/cob*) des maternalen (M) und paternalen Elters (V) sowie der Filialgeneration (F) 1 und 2 nach Einlagerung des *st1*-Gens aus dem Cytoplasma (2)

- links oben: in das Cytoplasma (1)
- rechts oben: in das Cytoplasma (5)
- unten: in das Cytoplasma (3).

Die Pflanzen der F₁- und F₂-Generation aller drei Kreuzungen zeigen das Hybridisierungsmuster der jeweiligen Mutterpflanze. Entsprechende Ergebnisse wurden auch mit den folgenden Enzym/Sondenkombinationen erzielt:

- für *st1* aus Cytoplasma (2) in (1):

EcoRI/ atp6, coxII, nad3, rrn18

DraI/ atp6, cob, coxII, nad3, rrn18

- für *st1* aus Cytoplasma (2) in (3):

EcoRI/ atp6, atp9, coxII, rrn18

DraI/ atp6, cob, coxII

- für *st1* aus Cytoplasma (2) in (5):

EcoRI/ atp6, coxII, nad3, rrn18

DraI/ atp6, cob, coxII, nad3, rrn18.

In Abbildung 6.3 sind die Hybridisierungsmuster der Enzym/Sondenkombination *EcoRI/cob* der Parental-, F₁- und F₂-Generation nach Kreuzung des Cytoplasmatyps (1) mit dem Cytoplasmatyp (5) unter Berücksichtigung des Restorergens *St2/st2* dargestellt.

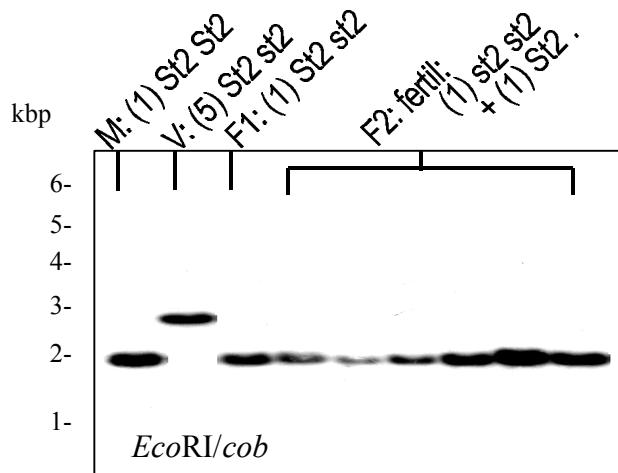


Abb. 6.3: Hybridisierungsmuster (*EcoRI/cob*) des maternalen (M) und paternalen Elters (V) sowie der Filialgeneration 1 und 2 nach Einlagerung des *st2*-Gens aus dem Cytoplasma (5) in das Cytoplasma (1).

Die Pflanzen der F₁- und F₂-Generation zeigen das Hybridisierungsmuster der Mutterpflanze. Entsprechende Ergebnisse wurden auch mit den folgenden Enzym/Sondenkombinationen erzielt:

EcoRI/ nad3, atp6

DraI/ cob, coxII, nad3.

Es wurde in insgesamt 8 getesteten Kreuzungen der Cytoplasmatyp der Mutter auf die Nachkommen bis zur F₂ unverändert weitergegeben. (Neben den oben dargestellten Kreuzungen wurde auch die Kreuzung Gr.9 x 2035/1, also Cytoplasmatyp (3) x (1) unter Berücksichtigung der Gene *M/m* und *N/n*, nach Restriktion mit *EcoRI* sowie *DraI* und Hybridisierung mit *atp6*, *cob* und *coxII* getestet, ohne Abbildung). Nach diesen Untersuchungen kann eine Vererbung der Mitochondrien vom paternalen Elter auf die Nachkommen ausgeschlossen werden. Weiterhin gibt es keine Hinweise auf einen Einfluß des kerngenetischen Hintergrunds noch der kerngenetischen Sterilitätsfaktoren, also der *GMS*-Gene *Wi/wi* und *St1/st1* sowie des Restorergens *St2/st2*, auf die mitochondriale Genomorganisation. Dies gilt ebenfalls für die Gene *M/m* und *N/n*. Nach früheren Untersuchungen von POTZ (1992) hat auch das Restorerger *X/x* keinen Einfluß auf die mitochondriale Genomorganisation. Dies wird durch die Untersuchungen aus Kapitel 3 bestätigt, bei denen die mitochondriale Genomorganisation in sterilen und restorierten Pflanzen verglichen wurde (vergl. Abb. 3.3 und Tabelle 3.3 sowie im Anhang Tabelle 11.1).

6.4 Diskussion

6.4.1 Der methodische Ansatz

Zur Überprüfung einer konstanten maternalen Vererbung der Mitochondrien ist die RFLP-Technik gut geeignet, auch wenn die Sensitivität dieser Methode zum Nachweis geringer DNA-Mengen nicht ausreicht und folglich "sublimons" in der Regel nicht nachgewiesen

werden. Heteroplasmatische Zustände oder geringe Transmissionen der paternalen Mitochondrien können also nicht nachgewiesen und folglich auch nicht völlig ausgeschlossen werden. Für die Beurteilung eines Cytoplasmotyps - beispielsweise hinsichtlich seiner Sterilitätseigenschaften - sind solche extrem seltenen DNA-Cirkele aber ohne Bedeutung, da sie nicht die Ausprägung des Phänotyps verändern (siehe unten).

6.4.2 Die Vererbung der Mitochondrien beim Schnittlauch im Vergleich zu anderen Spezies

In der Einleitung zu diesem Kapitel wurde bereits darauf hingewiesen, daß die Mitochondrien in der Regel uniparental maternal vererbt werden. Dennoch gibt es eine Reihe von Ausnahmen, besonders wenn in Betracht gezogen wird, daß die Vererbung der Mitochondrien in vergleichsweise wenigen Arten untersucht wurde.

Eine Gruppe von Gymnospermen-Arten, bei denen die Mitochondrien vorwiegend paternal vererbt werden, sind die Koniferen mit Ausnahme der Pinaceae und Taxaceae (zusammengefaßt in MOGENSEN 1996). Bei Angiospermen wurde eine solche Gruppe von Pflanzen mit biparentaler oder paternaler Vererbung der Mitochondrien nicht nachgewiesen. Dennoch gibt es auch hier einige Beispiele für Abweichungen von der konstanten maternalen Vererbung. Gehäuft scheint dies bei intergenerischen und intragenerischen Hybriden aufzutreten, beispielsweise bei Kreuzungen von *Hordeum* und *Secale* (SOLIMAN et al. 1987). Bei intergenerischen Hybriden von *Festuca pratensis* und *Lolium perenne* wurde erst in bestimmten Rückkreuzungen mit *L. perenne* uniparentale paternale Organellenvererbung (Chloroplasten und Mitochondrien) beobachtet, während die Hybriden selbst alle das Cytoplasma der Mutter aufwiesen (KIANG et al. 1994).

Auch bei Vererbungsstudien innerhalb einer Art konnte bei einigen Pflanzenarten eine paternale Transmission der Mitochondrien auf die Nachkommen festgestellt werden. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von *Pelargonium hortorum* (GUO und HU 1995) und *Nicotiana tabacum* (YU et al. 1994) zeigten, daß paternale Mitochondrien mindestens bis zur ersten Teilung der Zygote erhalten bleiben. Ob sie während des weiteren Wachstums der Pflanze erhalten bleiben, wurde allerdings nicht verfolgt. Quantitative cytologische Untersuchungen von RUSSEL (1987) an *Plumbago zeylanica* ergaben ein kritisches Verhältnis von paternalen zu maternalen Mitochondrien in der Zygote von 1:1000. RUSSEL diskutiert, daß ein solches Verhältnis entweder die Expression der paternalen Mitochondrien verhindert, eine Rekombination mit den maternalen Mitochondrien ausschließt, oder daß eine Genom-Balance bei diesem Verhältnis eintritt. Die Expression der mitochondrialen Gene wird so stark von den maternalen Mitochondrien dominiert sein, daß die Transmission der paternalen Mitochondrien auf so geringem Niveau keine phänotypischen Konsequenzen haben kann. Im Gegensatz dazu wurden bei der Gurke (*Cucumis sativus*) klarere Abweichungen von der maternalen Vererbung der Mitochondrien nachgewiesen (MATSUURA 1995). Bei Untersuchungen von HAVEY (1997)

zeigten 97% von insgesamt 70 Nachkommen eine uniparentale paternale Vererbung der Mitochondrien. Auch polymorphe PCR-Amplifikationsprodukte wurden in reziproken Kreuzungen ausschließlich durch den paternalen Elter vererbt, so daß eine strikte paternale Vererbung angenommen werden muß (MATSUURA und MIZUSAWA 1998). Auch bei der Melone (*Cucumis melo*) wurde eine paternale Vererbung der Mitochondrien festgestellt, während beim Kürbis (*Cucurbita pepo*) und der Wassermelone (*Citrullus lanatus*) eine maternale Vererbung erfolgt (HAVEY et al. 1998). Die Plastiden werden bei allen genannten Cucurbitaceae maternal vererbt. Auch bei Bananen (*Musa acuminata*) erfolgt eine paternale Vererbung der Mitochondrien und maternale Vererbung der Plastiden (FAURÉ et al. 1994).

Die durchgeführten Spaltungsanalysen beim Schnittlauch (vergl. Kapitel 4), bei denen die CMS als phänotypischer Marker für die Konstanz der maternalen Vererbung angesehen werden kann, und die molekulargenetischen Untersuchungen (RFLPs) weisen nicht darauf hin, daß paternale Mitochondrien an die Nachkommen vererbt werden. Allerdings kann aufgrund der Southern-Hybridisierungen nicht ausgeschlossen werden, daß wie in den oben beschriebenen Beispielen einige Mitochondrien des paternalen Elters bis in die Zygote gelangen. Diese würden dann aber höchstens substöchiometrisch erhalten oder gingen verloren, so daß sich die in den Southern-Hybridisierungen gezeigte eindeutige Dominanz der maternalen Mitochondrien ergibt (s. auch 6.4.1).

Das häufige Auftreten von paternaler Transmission der Mitochondrien in inter- und intragenerischen Kreuzungen könnte ein Hinweis darauf sein, daß die Kombination der verschiedenen Kerngenome einen Einfluß auf die mitochondriale Genomorganisation hat, daß heißt, daß bestimmte kerngenetische Faktoren nur in Verbindung mit bestimmten Konfigurationen des mitochondrialen Genoms zu lebensfähigen Individuen führen. Eine Beeinflussung der mitochondrialen Genomorganisation durch verschiedene Kerngenome konnte bei niederen Organismen (*Podospora*: BELCOUR et al. 1991; *S. cerevisiae*: ZWEIFEL und FANGMAN 1991), Menschen (ZEVIANI et al. 1989) und auch bei höheren Pflanzen nachgewiesen werden. Bei letzteren treten solche kerngenetischen Effekte bei *Brassica* (ERICKSON und KEMBLE 1990, 1993) und *Nicotiana* (HAKANSSON und GLIMELIUS 1991) auf. Ein Einfluß des Kerngenoms auf das Vorkommen linearer Plasmide ist für *Sorghum bicolor* (BAILEY-SERRES et al. 1986), *Brassica* ssp. (ERICKSON et al. 1989) und das CMS-S-Plasma (ESCOTE-CARLSON et al. 1990) von Mais nachgewiesen worden. Auch im Cytoplasma 350 von *Vicia faba* wird die Zahl und Identität der Plasmide mtp4 bis mtp11, die aus einer doppelten Rekombination zwischen den Plasmiden mtp1 und mtp2 entstehen, vom nuklearen Hintergrund beeinflusst (FLAMAND et al. 1993). In *Neurospora intermedia* wurden in bestimmten Stämmen Plasmid-Suppressorgene nachgewiesen, die eine Vererbung linearer und cirkulärer Plasmide des mitochondrialen Genoms verhindern (YANG und GRIFFITHS 1993).

Die genannten Beispiele zeigen, daß Kerngene die Organisation mitochondrialer Gene beeinflussen können. Allerdings ist in diesen Beispielen weder ein phänotypischer Effekt dieser kerngenetisch bedingten Veränderungen des mitochondrialen Genoms bekannt noch die Zahl der beteiligten Kerngene. Ein Beispiel, bei dem ein phänotypischer Effekt nachgewiesen wurde, ist die Amplifikation spezifischer Fragmente im mitochondrialen Genom von *Arabidopsis*, die durch das Kerngen *Chm/chm* ("chloroplast mutator") hervorgerufen wird und panaschierte Blätter bedingt (MARTINEZ-ZAPATER et al. 1992). Weitere Beispiele mit phänotypischer Ausprägung stehen in Verbindung mit der männlichen Sterilität und sollen in den folgenden Abschnitten gesondert betrachtet werden.

6.4.3 Einfluß von GMS-Genen auf die mitochondriale Genomorganisation

Hinweise auf einen Einfluß der GMS-Gene *Wi/wi* und *St1/st1* auf die Organisation der mitochondrialen Gene haben sich aufgrund der durchgeführten Untersuchungen nicht ergeben. Der einzige in der Literatur beschriebene Fall, bei dem ein GMS-Gen mit der Amplifikation bestimmter mitochondrialer Genombereiche in Verbindung gebracht wird, ist die *ms4*-Mutante bei *Nicotiana sylvestris*. Während einer *in vitro* Kulturphase entstand eine genisch männlich sterile Pflanze, bei der gleichzeitig eine Amplifikation mitochondrialer Moleküle erfolgte. Bei dem Wildtyp kommen diese Fragmente *in vivo* nur substöchiometrisch vor und werden während der *in vitro* Kulturphase auch nicht amplifiziert. Ein Einfluß des nuklearen Sterilitätsgens *ms4* auf die Rekombination oder Replikation dieser mitochondrialen Moleküle wird diskutiert (VITARD et al. 1992).

6.4.4 Einfluß von Restorergenen auf die mitochondriale Genomorganisation

Hinweise auf einen Einfluß der Restorergene *St2/st2* und *X/x* auf die Organisation der mitochondrialen Gene haben sich aufgrund der durchgeführten Untersuchungen nicht ergeben. Eine solche Beeinflussung wurde im CMS-System der Bohne (*Phaseolus vulgaris*) nachgewiesen. Die CMS-assoziierte *pvs*-Sequenz (vergl. 3.4.3) befindet sich auf einem 210kb-Molekül innerhalb der dreigeteilten mitochondrialen Genomorganisation (JANSKA und MACKENZIE 1993, vergl. Abb. 3.2). Bei Anwesenheit des Restorerallels *Fr* wird der 210kb-Cirkel mit der *pvs*-Sequenz, ähnlich wie bei den spontan auftretenden Revertanten, aus dem mitochondrialen Genom der Megasporen eliminiert, bzw. auf ein substöchiometrisches Level reduziert (MACKENZIE und CHASE 1990; HE et al. 1995; VAN HOUTEN und MACKENZIE in JANSKA et al. 1998). Von den übrigen Genen des 210kb-Cirkels liegen Kopien auf einem der beiden anderen Cirkel vor, so daß ihre Funktion gewährleistet ist. Das Restorergen wirkt intermediär, heterozygote Pflanzen sind folglich semisteril (HE et al. 1995). Ein weiteres Restorergen, *Fr2*, das posttranskriptional die Expression der *pvs*-Sequenz vermindert (CHASE 1994), verhindert gleichzeitig die Elimination der Sequenz durch das *Fr*-Restorergen (HE et al. 1995).

7 Die mitochondrial kodierten Proteine verschiedener Cytoplasmatypen und ihre Beeinflussung durch Restorer- und GMS-Gene

7.1 Einleitung

Zum Nachweis mitochondrial kodierter Proteine werden *in organello*-Translationen durchgeführt, bei denen eine Inkubation isolierter Mitochondrien mit radioaktiv markierten Aminosäuren erfolgt. Dabei werden die radioaktiven Aminosäuren während der mitochondrialen Proteinbiosynthese inkorporiert. Nach anschließender elektrophoretischer Trennung und Autoradiographie erfolgt eine selektive Schwärzung des Röntgenfilms durch die mitochondrial kodierten Translationsprodukte. Somit ist eine Abgrenzung zu den kernkodierten Proteinen der Mitochondrien möglich. Letztere sind durch Coomassie- oder Silberfärbung nachweisbar.

Die ersten *in organello*-Translationsstudien bei CMS-Pflanzen erfolgten an dem (T)-Sterilitätscytoplasma vom Mais und ergaben ein zusätzliches Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 13kDa, welches in anderen Cytoplasmatypen nicht gebildet wird und in restorierten Pflanzen um etwa 80% reduziert ist (FORDE et al. 1978; FORDE und LEAVER 1980). Gleichzeitig fehlt in dem T-Cytoplasma ein 21kDa-Polypeptid im Vergleich zu den anderen Cytoplasmatypen, ein Effekt der Restoration auf dieses Protein wurde jedoch nicht festgestellt (FORDE und LEAVER 1980). Spätere Untersuchungen ergaben, daß das 13kDa-Polypeptid das Produkt des in Kapitel 3 beschriebenen *T-urf13*-Gens ist (DEWEY et al. 1986; WISE et al. 1987a). Bis heute ist das T-Cytoplasma vom Mais mit dem 13kDa-Protein eines der am intensivsten erforschten CMS-Systeme geblieben. Dies ist nicht zuletzt dadurch bedingt, daß dieser Cytoplasmatyp neben der Sterilität eine starke Anfälligkeit gegenüber zwei pilzlichen Pathogenen besitzt. Maishybriden mit dem T-Cytoplasma wurden auf mehr als 85% der Maisanbaufläche der USA kultiviert, bis es 1969 und 1970 zu einer epidemischen Ausbreitung des "southern corn leaf blight" im Süden der USA kam. Die Krankheit zerstörte einen Großteil der Maisernte und konnte auf den pilzlichen Erreger *Bipolaris maydis* (Rasse T) zurückgeführt werden. Im Norden der USA verursachte ein anderer Pilz, *Phyllosticta maydis*, ähnliche Schäden ("yellow leaf blight") bei Pflanzen mit dem T-Cytoplasma, während Pflanzen mit anderen Cytoplasmen nur eine geringe Anfälligkeit zeigten (ULLSTRUP 1972, LEVINGS und SIEDOW 1992). Bei dem Versuch durch *in vitro*-Kultur Pflanzen auszulesen, die resistent gegen das T-Toxin

der Pilze sind, stellte sich heraus, daß die Resistenz nur erreicht werden kann, wenn gleichzeitig das CMS-induzierende 13kDa Protein nicht mehr gebildet wird, die resistenten Regenerate waren also gleichzeitig männlich fertile Revertanten (WISE et al. 1987b). Weitere Untersuchungen ergaben, daß Oligomere des 13kDa-Proteins in Verbindung mit dem T-Toxin große hydrophile Poren in der inneren Mitochondrienmembran bilden, die zu einer hohen Permeabilität führen, in deren Folge das Membranpotential und damit die Atmungskettenfunktionen nicht mehr gewährleistet sind (LEVINGS und SIEDOW 1992; RHOADS et al. 1998). Der Verlust der Membranintegrität ließ sich auch bei *Escherichia coli* beobachten, die mit T-*urf13* transformiert und mit dem T-Toxin behandelt wurden (DEWEY et al. 1988). Auch in *Saccharomyces cerevisiae* kann eine Anfälligkeit gegenüber dem Toxin durch Transformation mit T-*urf13* ausgelöst werden, wenn das Protein in die Mitochondrienmembran integriert wird (HUANG et al. 1990).

In anderen Pflanzenarten konnten ebenfalls CMS-spezifische Veränderungen im Proteinhinweis der Mitochondrien festgestellt werden (z.B. Petunie: NIVISON und HANSON 1989, Sonnenblume: HORN et al. 1991, MONÉGER et al. 1994, Schnittlauch: POTZ und TATLIOGLU 1993). Wie diese Proteinunterschiede letztlich die Sterilität bedingen, ist bis heute unklar geblieben. Beispielsweise wird das oben beschriebene 13kDa-Protein in verschiedenen, wenn nicht in allen Geweben der Maispflanzen exprimiert, zeigt aber nur in den Antheren durch die Degeneration des Tapetums einen phänotypischen Effekt (WARMKE und LEE 1977; HACK et al. 1991). Nach Aufklärung der Interaktion mit dem T-Toxin formulierte LEVINGS (1993) eine Hypothese, nach der es in den Antheren eine ähnliche Substanz (X-Faktor) geben könnte, die ebenso wie das T-Toxin mit dem 13kDa-Protein interagiert. Ein solcher X-Faktor als gewebespezifische Analogon zum T-Toxin war bereits 1974 von FLAVELL diskutiert worden. Diese Substanz konnte allerdings bis heute nicht nachgewiesen werden.

Im folgenden werden die Ergebnisse von *in organello*-Translationsstudien des in den vorangegangenen Kapiteln nachgewiesenen neuen Sterilitätscytoplasmas (5) beim Schnittlauch im Vergleich zu den Normalcytoplasmen (1) und (2) dargestellt. Dabei werden neben den sterilen auch restorierte Pflanzen untersucht. Weiterhin werden sterile und fertile Pflanzen der *Wi/wi*-GMS bezüglich ihrer mitochondrialen Translationsprodukte verglichen, um einen möglichen Einfluß dieses GMS-Gens auf die mitochondriale Proteinbiosynthese zu untersuchen. Um gewebespezifische Expressionsunterschiede von solchen zu trennen, die im kausalen Zusammenhang mit der CMS und GMS stehen, werden zunächst die mitochondrialen Expressionsmuster verschiedener Gewebe bei fertilen Pflanzen verglichen. Im Anschluß werden die Ergebnisse durch einen Vergleich mit Untersuchungen an einigen ausgewählten Pflanzenarten interpretiert und Gemeinsamkeiten sowie Unterschiede in den verschiedenen Systemen diskutiert.

7.2 Material und Methoden

7.2.1 Pflanzenmaterial

Für die *in organello*-Synthesen wurden Einzelpflanzen der Linien 11013 und 11038 verwendet, die bezüglich des *GMS*-Gens *Wi/wi* spalten und bei denen das Normalcytoplasma (1) bzw. (2) vorliegt. Weiterhin wurden Einzelpflanzen der Linie 10040 verwendet, die das neue Sterilitätscytoplasma (5) trägt und bezüglich des Restorergens *St2/st2* spaltet. Zusätzlich wurden zwei Pflanzen der Linie 15005 aufgenommen, die das Sterilitätscytoplasma (5) besitzen, und das Restorergergen im homozygot dominanten Zustand tragen. In der Tabelle 7.1 sind die Einzelpflanzennummern, deren jeweiliger Genotyp und der resultierende Phänotyp angegeben.

Tab. 7.1: Pflanzenmaterial zur Charakterisierung der mitochondrial kodierten Proteine

Pflanzennummer	Genotyp	Phänotyp
11013/ 2	(1) <i>wi wi</i>	steril
11	(1) <i>Wi .</i>	fertil
18	(1) <i>Wi .</i>	fertil
92	(1) <i>Wi Wi</i>	fertil
11038/ 49	(2) <i>wi wi</i>	steril
52	(2) <i>wi wi</i>	steril
1	(2) <i>Wi .</i>	fertil
2	(2) <i>Wi .</i>	fertil
8	(2) <i>Wi .</i>	fertil
10040/ 16	(5) <i>st2 st2</i>	steril
41	(5) <i>st2 st2</i>	steril
60	(5) <i>st2 st2</i>	steril
12	(5) <i>St2 st2</i>	restoriert
17	(5) <i>St2 st2</i>	restoriert
32	(5) <i>St2 St2</i>	restoriert
62	(5) <i>St2 St2</i>	restoriert
15005/ 1	(5) <i>St2 St2</i>	restoriert
5	(5) <i>St2 St2</i>	restoriert

7.2.2 Kontaminationsfreie Aufzucht von Pflanzen *in vitro*

Die Genotypen wurden nach einer von RAUBER und GRUNEWALD (1988) beschriebenen Methode *in vitro* aufgenommen und kultiviert. Dazu wurden Schnittlauchdolden im Knospenstadium von Pflanzen aus dem Gewächshaus abgenommen und eine Oberflächensterilisation für fünf Minuten in der Sterilisationslösung durchgeführt. Die Knospen wurden anschließend zweimal in autoklaviertem entionisiertem Wasser gespült. Mit einem Skalpell wurde die Knospe am Blütenboden schräg abgeschnitten, so daß das Meristem des Blütenbodens getroffen wurde. Der auf etwa 3mm eingekürzte Blütenstiel wurde mit einer Pinzette gefaßt und die entstandene Schnittfläche des Blütenbodens zunächst für 3-4 Wochen in das Regenerationsmedium gesenkt. Anschließend wurden die Explantate auf Sproßbildungsmedium umgesetzt. Nach weiteren 3-4 Wochen erfolgte eine Umsetzung auf

frisches Sproßbildungsmedium und anschließend auf MS-Medium ohne Phytohormone, worauf die Bewurzelung der Sprosse einsetzte. Die *in vitro*-Kulturen wurden dann in einem 3-6-wöchigem Rhythmus umgesetzt und die sich bildenden Bulben vereinzelt. Laub und Wurzeln wurden an der Bulbe abgeschnitten und für die Mitochondrienisolierungen genutzt. Nach etwa 3 Wochen sind die Pflanzen nachgewachsen, so daß erneut Wurzeln und Laub geerntet werden können. Die Kultivierung erfolgte in Klimaschränken (Fa. Rubarth) bei 20°/12°C (Tag/Nacht) und einer Photoperiode von 16 Stunden.

Verwendete Chemikalien:

- Sterilisationslösung:
 - 1% NaCl
 - 1% Natrium-Hypochlorid
 - 0,25% Twen
- MS-Medium nach MURASHIGE und SKOOG (1962), ohne Vitamine und Phytohormone.
- Regenerationsmedium:
 - MS-Medium
 - 2ppm 2-Naphtylessigsäure (2-NES)
 - 2ppm Benzylaminopurin (BAP)
- Sproßbildungsmedium:
 - MS-Medium
 - 1ppm 2-Naphtylessigsäure (2-NES)
 - 5ppm Benzylaminopurin (BAP)

7.2.3 Isolierung intakter Mitochondrien

Die Mitochondrienisolierung erfolgte nach einer abgeänderten Methode von BOUTRY et al. (1984). Die notwendigen Arbeitsschritte wurden auf Eis und mit autoklavierten und vorgekühlten Utensilien durchgeführt. Die Isolierung aus 10g Blüten erfolgte nach einer Oberflächensterilisation der im Gewächshaus geernteten Knospen (analog zur Oberflächensterilisation in 7.2.2). Für die Aufarbeitung des *in vitro*-Materials wurden jeweils 5-8g Laub und Wurzeln getrennt in verschließbare Gläser mit 50ml Homogenisierungspuffer geerntet. Das Pflanzenmaterial wurde in dem Homogenisierungspuffer gemörsert und durch zwei Lagen in Miracloth (Fa. Calbiochem) eingeschlagene Milchfilter in ein 250ml Zentrifugenbecher filtriert. Der Preßkuchen wurde in den Mörser zurückgeführt, in weiteren 50ml Homogenisierungspuffer aufgenommen, erneut gemörsert und filtriert. Der Vorgang wurde ein weiteres Mal wiederholt. Anschließend wurden die Zentrifugenbecher auf ein Endvolumen von 200ml austariert, und es erfolgte eine differentielle Zentrifugation. Zunächst werden dabei für 5min bei 3500xg die schneller sedimentierenden Zelltrümmer und der Großteil der Chloroplasten pelletiert. Anschließend wurde der Überstand in einen neuen Zentrifugenbecher dekantiert und durch die zweite Zentrifugation für 25min bei 17000xg die Mitochondrien pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets mit einem sterilem Pinsel in 1,6ml 1x Resuspensionspuffer aufgenommen, in einem Glas-Teflon Potter homogenisiert und auf einen Percoll-Gradienten geschichtet. Während der Zentrifugation für 45min in einer Ultrazentrifuge bei 70000xg wandern die noch verbliebenen Chloroplasten in die obere 14%ige Percollphase

des Gradienten ein, an der Grenze zur 26%igen Phase bleiben sie jedoch hängen, während die Mitochondrien diese Phase passieren und an der Grenze zur 45%igen Phase bandieren. Mit Hilfe einer an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossene Pasteurpipette wurden die oberen Phasen bis zur Mitochondrienbande abgesaugt, die Bande mit einer Pasteurpipette entnommen und in ein Zentrifugenröhrchen mit 25ml Resuspensionspuffer überführt. Zur Entfernung des Percolls wurden die Mitochondrien einige Male geschwenkt, für 25min bei 15000xg pelletiert, der Überstand entfernt und erneut in 25ml Resuspensionspuffer gewaschen. Die anschließende Zentrifugation für 15min bei 15000xg ergab ein instabiles Pellet, das nach Zugabe von 1ml Resuspensionspuffer mit einer Pasteurpipette in ein 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und anschließend noch einmal für 8min bei 10000xg pelletiert wurde. Der Überstand wurde erneut entfernt und die Mitochondrien in 100µl Resuspensionspuffer aufgenommen.

Verwendete Chemikalien:

- Homogenisierungsmedium:
 - 0,4M Mannit
 - 25mM MOPS
 - 1mM EGTA
 - pH 7,8 mit KOH eingestellt
 - autoklavieren
 - vor Gebrauch Zugabe von 0,1% BSA
 - 0,1% Polyvinyl-Pyrrolidone (PVP 40)
 - 10mM β-Mercaptoethanol.
- 2x Resuspensionspuffer:
 - 0,8M Mannit
 - 20mM KH₂PO₄
 - pH 7,2 mit KOH eingestellt.
- Percoll-Gradient (durch Unterschichtung mit einer 10ml-Glaspipette):
 - 9,5ml 14% Percoll in 1x Resuspensionspuffer
 - 14ml 26% Percoll in 1x Resuspensionspuffer
 - 8ml 45% Percoll in 1x Resuspensionspuffer.

7.2.4 *In organello* Translation mit ³⁵S-Methionin und ³⁵S-Cystein

Die *in organello*-Translationen wurden nach einem abgeänderten Protokoll von LEAVER et al. (1983) durchgeführt. Insbesondere wurde die Aminosäurekonzentration im Vergleich zu dem ursprünglichen Protokoll erhöht (LIND et al. 1991) und neben ³⁵S-Methionin auch ³⁵S-Cystein eingesetzt (SCHNEIDER und TATLIOGLU 1996b). Dazu wurden 50µl Mitochondriensuspension direkt nach der Isolierung mit 150µl Inkubationsmix (inklusive der Aminosäuren) und 50µl Energiemix für 90min in einem Wasserbad bei 25°C geschüttelt. Inkubationsmix und Energiemix wurden getrennt angesetzt um eine Variation der Energiequellen und den Zusatz von Antibiotika zu ermöglichen. Die Konzentrationen des Inkubationsmix wurden so gewählt, daß dieser aliquotiert eingefroren werden konnte und vor der *in organello*-Translation die nichtradioaktiven und radioaktiv markierten Aminosäuren ergänzt werden konnten. Für den Energiemix wurde das Succinat jeweils frisch angesetzt und zu einer aliquotierten ADP-Stammlösung hinzugegeben.

Nach 90-minütiger Inkubation wurde zur Bestimmung der inkorporierten Aktivität (verändert nach MANS und NOVELLI 1961) ein 5µl-Aliquot auf ein 1cm² großes Whatman-Papierstückchen getropft. Dieses wurde nach kurzer Antrocknung für etwa 1min in 10%ige (w/v) Trichloressigsäure mit 10mM Methionin überführt. Die Proteine präzipitieren und werden dadurch an das Whatman-Papier gebunden. Das Methionin soll unspezifisch anhaftendes radioaktives Methionin verdrängen, so daß bei der späteren Scintillationsmessung nur Aktivität erfaßt wird, die durch den Einbau der radioaktiven Aminosäuren in die mitochondrialen Proteine bedingt ist. Auf die Zugabe von nichtradioaktivem Cystein wurde verzichtet, da der Anteil des radioaktiv markierten Cysteins im Vergleich zum Methionin im Translationsmix nur gering ist. Die Inkorporation wurde nach Entnahme des 5µl-Aliquots durch Zugabe von 1ml eiskaltem Methioninpuffer gestoppt. Die Mitochondrien wurden durch Zentrifugation für 5min bei 15000xg pelletiert, der Überstand mit einer Pipette entfernt und bei -20°C gelagert. Die Whatman-Papierstückchen wurden 1-3 Tage in der 10%igen Trichloressigsäure bei 4°C aufbewahrt. Anschließend erfolgten Waschschriffe in jeweils ausgewechselter 5%iger Trichloressigsäure für 15min bei Raumtemperatur, 30min bei 90°C und 15min bei Raumtemperatur. Das Wasser wurde anschließend durch 30min Inkubation in Ethanol absolut bei 37°C und weiteren 15min bei Raumtemperatur nach Auswechseln des Ethanols entzogen. Die Papierstücke wurden für mindestens eine Stunde getrocknet. Die Messung der inkorporierten Radioaktivität erfolgte in einem Scintillationsmeßgerät (Fa. Beckman) in 5ml Scintillationscocktail (Fa. Roth). Zur Bestimmung der Hintergrundstrahlung wurde ein Aliquot des Inkubationsmixes (also ohne Mitochondrien) entnommen und die gemessene Aktivität um das kleinere Volumen im Vergleich zu den Mitochondrien-Proben bereinigt. Dazu wurden die Meßwerte der Proben entsprechend ihrem Volumen von 250µl mit 50, der Meßwert für die Hintergrundstrahlung entsprechend dem Volumen des Inkubationsmixes von 150µl mit dem Faktor 30 multipliziert.

Verwendete Chemikalien:

- Inkubationsmix (die angegebenen Molaritäten sollen bei der Inkubation, also nach Zugabe der Mitochondrien und des Energiemixes erreicht werden, der Mix ist folglich 1,66-fach konzentriert anzusetzen):

250mM Mannit (autoklaviert)

90mM KCl (autoklaviert)

10mM MgCl₂ (autoklaviert)

10mM Tricine (Stammlösung: 0,2M pH: 7,2; autoklaviert)

1mM EGTA (Stammlösung: 0,1M pH: 7,2, autoklaviert)

5mM Kaliumphosphatpuffer (pH: 7,2 nach SAMBROOK et al. 1989, autoklaviert)

2mM DTT (Stammlösung 0,1M; sterilfiltriert)

1mM GTP (sterilfiltriert)

je 250 µM von 20 nichtradioaktiven Aminosäuren

1,3MBq *In vitro* Cell Labelling Mix (70% ³⁵S-Methionin 30% ³⁵S-Cystein, >37TBq/mmol Methionin, Fa. Amersham)

Die einzelnen Komponenten wurden getrennt angesetzt, teilweise als Stammlösungen, teilweise wurde die für ein bestimmtes Endvolumen einzusetzende Menge in Wasser gelöst, autoklaviert bzw. sterilfiltriert und die Komponenten anschließend vereinigt. Der so hergestellte Inkubationsmix wurde in Aliquots bei -20°C gelagert und vor Gebrauch durch Zugabe des nichtradioaktiven Aminosäuremixes und der radioaktiven Aminosäuren ergänzt. In Vorversuchen wurde dem

Inkubationsmedium 800µM Erythromycin und 100µM Cycloheximid zugegeben. Diese Antibiotika hemmen die Translation an plastidären bzw. cytosolischen Ribosomen. Da eine Veränderung im Translationsmuster der isolierten Mitochondrien nicht beobachtet wurde, kann davon ausgegangen werden, daß diese frei von translationsaktiven Verunreinigungen sind. Dies bestätigt frühere Versuche von POTZ (1992).

- Energiemix (die angegebenen Molaritäten sollen bei der Inkubation, also nach Zugabe der Mitochondrien und des Inkubationsmixes erreicht werden, der Mix ist folglich 5-fach konzentriert anzusetzen):
 - 10mM Succinat (frisch angesetzt)
 - 2mM ADP (Stammlösung: 60mM; sterilfiltriert, Lagerung bei -20°C).
- Methioninpuffer:
 - 0,4M Mannit
 - 10mM Methionin
 - 1mM EGTA
 - 10mM Tricine (pH: 7,2).
- Trichloressigsäure:
 - 10%ig (w/v) mit 10mM Methionin
 - 5%ig (w/v).
- Ethanol.
- Scintillationscocktail (Fa. Roth).

7.2.5 Polyacrylamid-Gelelektrophorese mitochondrialer Polypeptide

Zur elektrophoretischen Trennung der Proteine wurden die Mitochondrien in SDS-Extraktionspuffer aufgenommen, so daß 30µl mit 400000-600000 cpm inkorporierter Radioaktivität pro Probe aufgetragen werden konnten. Zuvor wurden die Proben in dem SDS-Extraktionspuffer gevortext und für 30min bei 40°C inkubiert. Als elektrophoretische Trennverfahren dienten Polyacrylamid-Gelelektrophoresen nach LAEMMLI (1970) und nach SCHÄGGER und von JAGO (1987). Letztgenannte Autoren verwendeten Tricin statt Glycin in der Pufferlösung und erzielten damit wesentlich bessere Trennergebnisse bei kleineren Proteinen im Bereich unter 15kDa. Alle im Ergebnisteil dieses Kapitels gezeigten Autoradiographien sind nach elektrophoretischer Trennung mit dieser Methode entstanden, die im folgenden beschrieben ist.

Die Polyacrylamidgele wurden mit einem Spacerabstand von 0,75mm zwischen zwei Glasplatten (20x20cm) gegossen, indem zunächst ein 12%T / 3%C Trenngel (16cm) eingefüllt und mit der Overlay-Lösung überschichtet wurde. Nach erfolgter Polymerisation wurde die Overlaylösung abgegossen und das Sammelgel (4cm) dem Trenngel vorgeschaltet. Die vertikale Elektrophorese wurde in einer Kammer der Fa. Biorad für 1h bei 30V und ca. 14h bei 110V (entspricht 40mA am Start, 13mA am Ende) durchgeführt. Nach der Trennung erfolgte eine Fixierung für 30min, und anschließend wurden die Gele für 5h bei 60°C in einem Vakuumtrockner getrocknet. Die Autoradiographie erfolgte für 2-14 Tage bei -80°C mit Hyperfilm^{MP}-Röntgenfilmen (Fa. Kodak). Einige Gele wurden vor der Trocknung für 15min in AmplifyTM (Fa. Amersham) geschwenkt. Diese Fluorographie verkürzt die Expositionszeit der Röntgenfilme um 50%, allerdings zeigt sich ein stärkerer Hintergrund.

Verwendete Chemikalien:

- SDS-Extraktionspuffer:
 - 10% (w/v) SDS
 - 30% (w/v) Glycerin
 - 4% β Mercaptoethanol
 - 0,02% (w/v) Serva blue G
 - 100mM Tris (pH 6,8 mit HCl eingestellt).
- Gelpuffer:
 - 0,3% SDS
 - 3M Tris (pH: 8,45 mit HCl eingestellt).
- Overlaylösung:
 - 0,1% SDS
 - 1M Tris (pH: 8,45 mit HCl eingestellt).
- Trenngel:
 - 12%T / 3%C Polyacrylamid (T = totale Konzentration der Monomere Acrylamid + Bisacrylamid; C = Teil des "crosslinkers" Bisacrylamid von der Gesamtkonzentration)
 - 10ml Gelpuffer
 - 4g Glycerin
 - ad 30ml H₂O bi-dest.
 - 150 μ l 10%iges (w/v) Ammoniumpersulfat (APS)
 - 15 μ l Temed.
- Sammelgel:
 - 4%T / 3%C Polyacrylamid
 - 3,1ml Gelpuffer
 - ad 12,5ml H₂O bi-dest.
 - 100 μ l 10%iges (w/v) Ammoniumpersulfat (APS)
 - 10 μ l Temed.
- 10x Anodenpuffer:
 - 2M Tris (pH: 8,9 mit HCl).
- Kathodenpuffer:
 - 0,1M Tricine
 - 0,1% (w/v) SDS
 - 0,1M Tris (pH liegt bei 8,25, nicht einzustellen).
- Molekulargewichtsmarker: Rainbow-Coloured Marker, low molecular weight range: 2,35-46kDa (Fa. Amersham)
- Fixierlösung:
 - 50% (v/v) Methanol
 - 10% (v/v) Essigsäure

7.3 Ergebnisse

7.3.1 Gewebespezifische Expression eines mitochondrial kodierten Proteins im Laub im Vergleich zu den Wurzeln

In der Abbildung 7.1.A sind die mitochondrialen Translationsmuster aus Laub und Wurzeln der *in vitro*-Kulturen dargestellt. Ein beim Laub zusätzlich exprimiertes Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 27kDa ist durch einen Pfeil markiert. Dieses fehlt in den Wurzeln oder wird nur äußerst schwach exprimiert. Dieser gewebespezifische Unterschied ist auch in der Abbildung 7.3 zu erkennen.

Abbildung 7.1.B zeigt eine Autoradiographie von Proteinen nach Isolierung der Mitochondrien aus Knospen aus dem Gewächshaus. Die mitochondrialen Proteine sind von Bakterienproteinen überlagert, so daß eine Auswertung der aus Knospen isolierten Mitochondrien nicht erfolgen konnte. Die Etablierung einer Methode zur Erzeugung von Knospen bei den *in vitro*-Kulturen erschien zu aufwendig und wurde deshalb nicht durchgeführt.

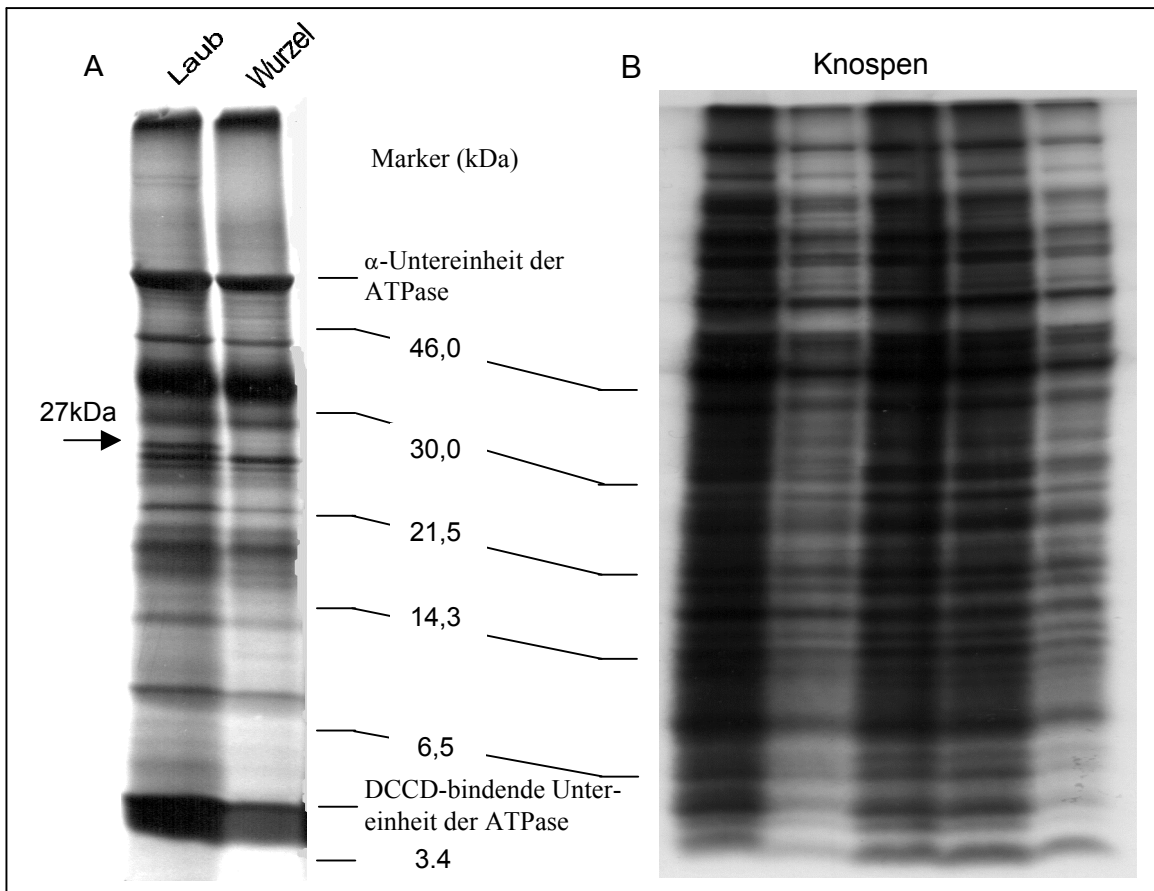


Abb. 7.1: Gewebespezifische Expression eines 27kDa-Polypeptids im Laub

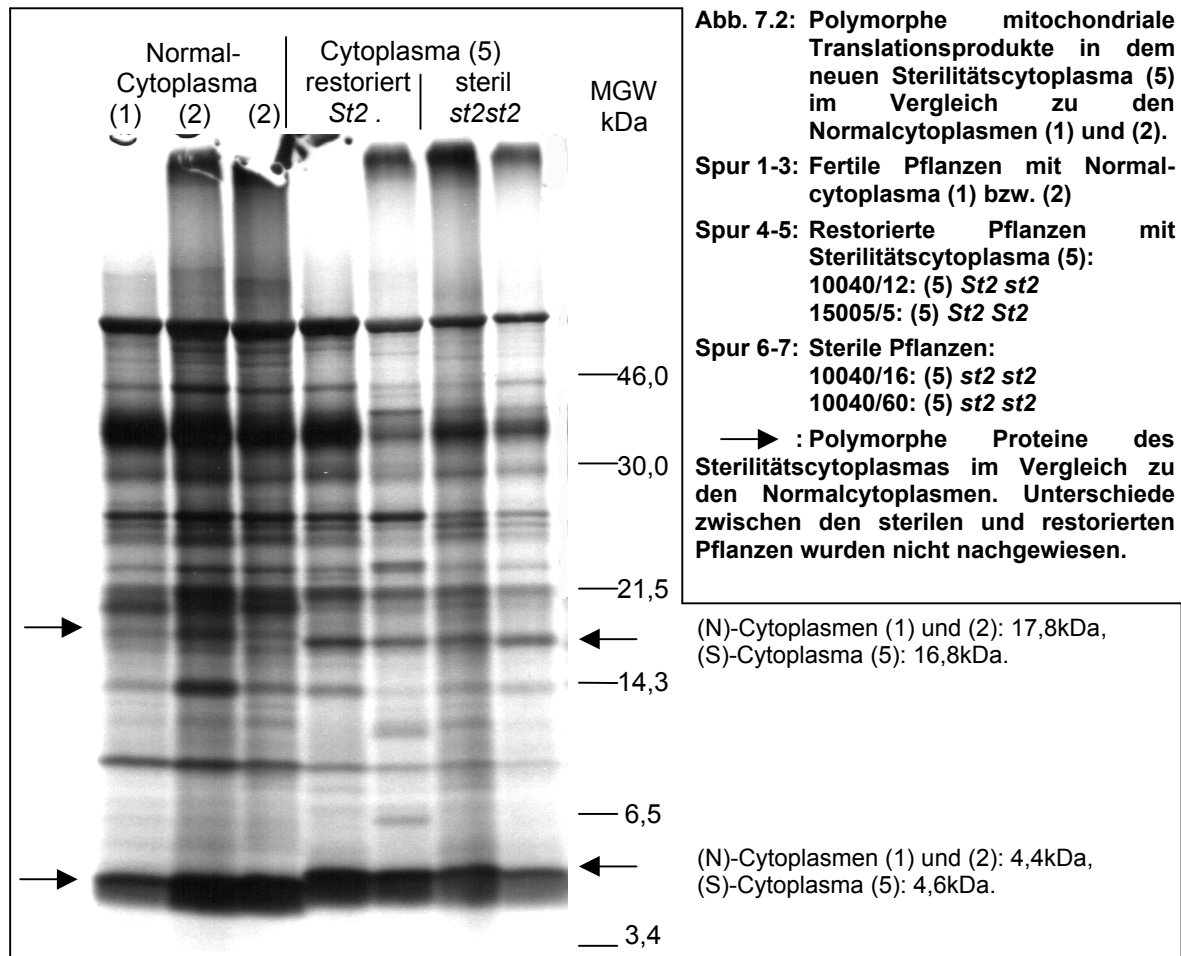
A: Vergleich der mitochondrial kodierten Polypeptide im Laub und in den Wurzeln. Der Pfeil markiert das zusätzlich exprimierte 27kDa Polypeptid im Laub.

B: Ergebnis der *in organello*-Proteinbiosynthese nach Aufarbeitung der Mitochondrien aus Knospen aus dem Gewächshaus: Bakterienproteine überlagern die mitochondrial kodierten Proteine.

Die α -Untereinheit der ATPase und das Dicyclohexylcarbodiimid (DCCD)-bindende Proteolipid des gleichen Polypeptidkomplexes können identifiziert werden, da es in den entsprechenden Molekulargewichtsbereichen keine weiteren Proteine gibt, die so charakteristisch stark exprimiert werden, und diese Proteine beim Mais und der Gurke charakterisiert wurden (LEAVER und GRAY 1982; HACK und LEAVER 1984). Während das Molekulargewicht des größten Produkts der mitochondrialen Proteinbiosynthese, der α -Untereinheit der ATPase, mit etwa 54kDa etwas größer als bei anderen Pflanzenarten ist (BOUTRY et al. 1984), hat das DCCD-bindende Proteolipid beim Schnittlauch mit etwa 4,4kDa ein etwas kleineres Molekulargewicht als in anderen Pflanzenarten (Mais und Gurke: 6-8kDa: LEAVER und GRAY 1982; HACK und LEAVER 1984; BOUTRY et al. 1984).

7.3.2 Mitochondriale Expressionsunterschiede in dem neuen Sterilitätscytoplasma (5) im Vergleich zu den Normalcytoplasmen (1) und (2)

In der Abbildung 7.2 sind in den drei linken Spuren die mitochondrialen Expressionsmuster der Wurzeln von fertilen Pflanzen mit den Normalcytoplasmen (1) und (2) dargestellt. In den vier rechten Spuren sind die Expressionsmuster des neuen Sterilitätscytoplasmas (5) zu sehen, Spur vier und fünf von restorierten Genotypen, Spur sechs und sieben von sterilen Genotypen.



Es sind zwei polymorphe Banden zwischen dem neuen Sterilitätscytoplasma und den Normalcytoplasmen erkennbar. Während bei den Normalcytoplasmen ein Protein mit einem Molekulargewicht von 17,8kDa zu sehen ist, fehlt dieses bei dem Sterilitätscytoplasma. Statt dessen ist ein zusätzliches Protein mit einem etwas kleineren Molekulargewicht von etwa 16,8kDa sichtbar. Bei den Normalcytoplasmen ist unterhalb des 17,8kDa-Proteins ein weiteres Protein zu sehen. Dieses ist auf den Original-Röntgenfilmen auch bei dem Sterilitätscytoplasma zu erkennen, in der fotografischen Reproduktion ist es aufgrund der fast identischen gelelektrophoretischen Mobilität jedoch kaum von dem 16,8kDa-Protein zu unterscheiden.

Ein weiterer Polymorphismus ist am unteren Bildrand zu erkennen. Hier ist das DCCD-bindende Proteolipid des Sterilitätscytoplasmas mit 4,6kDa im Vergleich zu 4,4kDa in den

Normalcytoplasmen vergrößert. Neben diesen qualitativen Unterschieden traten quantitative Unterschiede bei einzelnen Proteinen auf, die aber nicht reproduzierbar sind und somit als zufällig angesehen werden müssen.

7.3.3 Die mitochondriale Proteinbiosynthese bleibt von dem GMS-Gen *Wi/wi* unbeeinflusst

In der Abbildung 7.3 sind mitochondriale Translationsmuster von Pflanzen der Nachkommenschaft 11038 dargestellt, die bezüglich des *Wi/wi*-Gens spaltet. Zwischen sterilen und fertilen Pflanzen wurden weder im Laub noch in den Wurzeln Unterschiede nachgewiesen. Das im Laub zusätzlich gebildete 27kDa-Polypeptid im Vergleich zu den Wurzeln (vergl. Abb. 7.1) ist erkennbar. Neben dem Cytoplasmatyp (2) in der Nachkommenschaft 11038 konnten auch bei *wi*-sterilen und fertilen Pflanzen mit dem Cytoplasmatyp (1), Nachkommenschaft 11013, keine Unterschiede festgestellt werden.

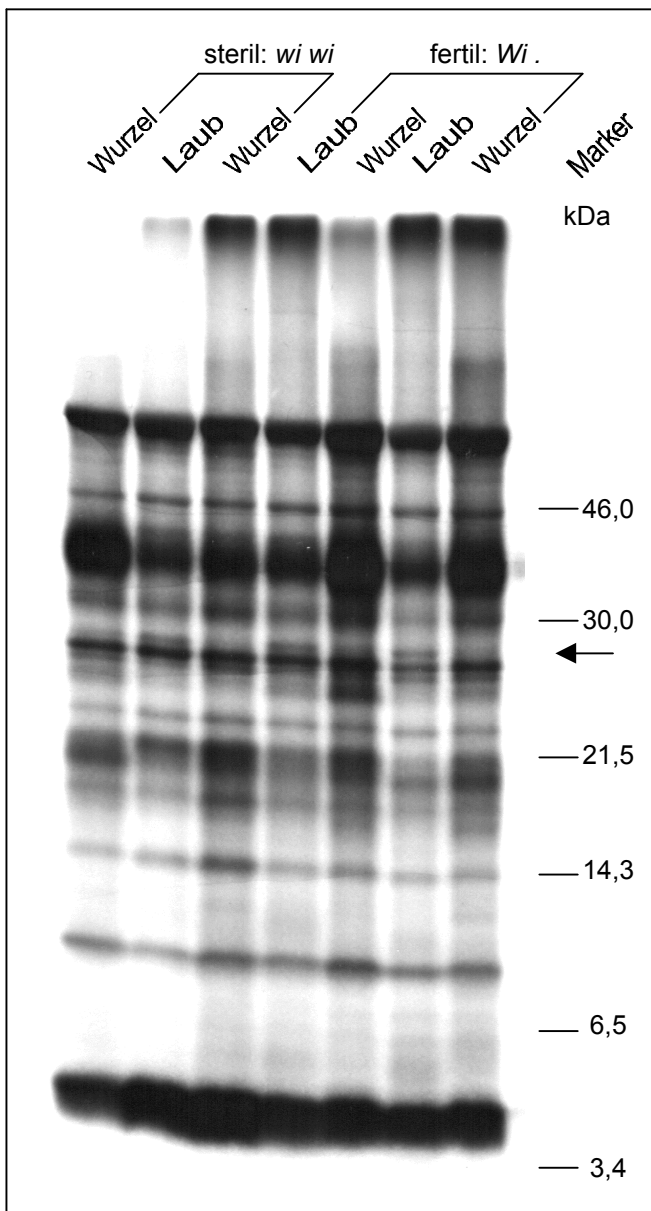


Abb. 7.3: *In organello* - Translationsmuster von *wi*-genisch männlich sterilen und fertilen Pflanzen mit dem Cytoplasmatyp (2)

Spur 1: Wurzeln der sterilen Pflanze 11038/49

Spur 2+3: Laub und Wurzeln der sterilen Pflanze 11038/52

Spur 4+5: Laub und Wurzeln der fertilen Pflanze 11038/1

Spur 6+7: Laub und Wurzeln der fertilen Pflanze 11038/8

Der Pfeil markiert das in den sterilen und fertilen Pflanzen im Laub zusätzlich gebildete 27kDa-Polypeptid.

7.4 Diskussion

7.4.1 Der methodische Ansatz

Die *in organello*-Proteinbiosynthesen beim Schnittlauch haben sich als eine sehr arbeitsaufwendige Methode erwiesen, da zunächst eine Anzucht von Pflanzenmaterial *in vitro* erfolgen muß, um eine Kontamination der zu isolierenden Mitochondrien durch Bakterien zu vermeiden (vergl. 7.3.1). Bei anderen Pflanzenarten wird in der Regel mit Pflanzen gearbeitet, die unter sterilen Bedingungen ausgekeimt sind. Beim Schnittlauch bilden die Keimlinge nicht genügend Pflanzenmasse, so daß diese Methode zunächst nicht möglich erschien. Bei den Untersuchungen stellte sich heraus, daß sich das Wurzelmaterial wesentlich besser zur Aufreinigung biologisch aktiver Mitochondrien eignet. Eine Vermischung mit Blättern hat sich als ungünstig erwiesen, da während der Percoll-gradientenzentrifugation in der oberen Phase Schlieren gebildet wurden, die auf Präzipitationen hinweisen und das Einwandern der Mitochondrien behindern und folglich die Ausbeute herabsetzen. Die Menge an Mitochondrien, die von Isolierungen aus Blättern gewonnen werden konnten, war in der Regel geringer als bei Isolierungen aus Wurzeln. Zudem ergaben sich bei den Mitochondrien aus Wurzeln deutlich höhere Inkorporationsraten der radioaktiv markierten Aminosäuren von 800000-1600000 cpm pro Inkubationsansatz von 250µl, während mit Mitochondrien aus Blättern selten Scintillationsmeßergebnisse von über 400000 cpm erzielt wurden, meistens lagen sie noch deutlich darunter. Diese Ergebnisse sind für weitere Untersuchungen von Bedeutung, da hochaktive Mitochondrien die Voraussetzung für gut auswertbare Autoradiographien sind. Es ist nach diesen Ergebnissen sogar denkbar, *in organello*-Proteinbiosynthesen mit Mitochondrien aus Keimlingswurzeln durchzuführen und so die *in vitro*-Aufnahme der Pflanzen zu umgehen. Allerdings müßte dazu Saatgut in ausreichenden Mengen produziert werden. Ein mit den *in organello*-Synthesen nicht zu lösendes Problem bleibt der Nachweis gewebe-spezifischer Effekte in den Blüten, da eine Aufreinigung von Mitochondrien aus Gewächshausmaterial aufgrund der Kontamination mit Bakterien nicht möglich ist, und für die Etablierung einer Methode zur Blüteninduktion bei den *in vitro*-Kulturen erheblicher Aufwand notwendig wäre. Andere Strategien erscheinen eher praktikabel, beispielsweise Hybridisierungen mit Antikörpern. Diese können nach Isolierung der CMS-spezifischen DNA-Sequenzen hergestellt werden, wenn die CMS-Sequenzen in Bakterien transformiert und exprimiert werden. Die Isolierung der entsprechenden Proteine aus den Bakterien ist wesentlich einfacher möglich als eine direkte Isolierung der mitochondrialen Proteine aus den Gelen, da die Mengen, die mit den bisher erreichten Optimierungen der Versuchsbedingungen zu isolieren sind, zu gering wären.

7.4.2 Mitochondrial kodierte Proteine in genisch männlich sterilen und fertilen Pflanzen

In den durchgeführten Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß das Gen *Wi/wi* genische männliche Sterilität bedingt, da es in vier Cytoplasmatypen ausgeprägt wird, die sich bezüglich der Organisation ihrer mitochondrialen Gene unterscheiden (vergl. Kapitel 4). Ein cytoplasmatischer Erbfaktor dieser Sterilität kann folglich ausgeschlossen werden. Die *in organello*-Translationsstudien sollten Aufschluß darüber geben, ob das mitochondriale Translationsmuster durch das Gen *Wi/wi* beeinflusst wird. Dazu wurden die Translationsprodukte von Laub und Wurzeln steriler und fertiler Pflanzen in zwei Cytoplasmatypen verglichen. Unterschiede wurden nicht festgestellt, so daß das GMS-Gen *Wi/wi* die Expression der mitochondrialen Gene nicht zu beeinflussen scheint. Hinweise, daß GMS-Gene die Mitochondrien beeinflussen könnten, wurden bei *Nicotiana sylvestris* gefunden. Dort ergab die *in organello*-Proteinbiosynthese männlich steril blühender Regenerate aus Protoplastenkultur ein mitochondriales Proteinmuster, das sich von den fertilen Ausgangspflanzen unterscheidet und dem zuvor bekannter CMS-Pflanzen gleicht (DE PAEPE et al. 1990). Die männlich steril blühenden Regenerate ließen sich bezüglich ihrer mitochondrialen Genomorganisation jedoch nicht von den Ausgangspflanzen unterscheiden und wurden deshalb der GMS zugeordnet. Allerdings fehlt bei diesen Versuchen ein klarer klassisch genetischer Nachweis der GMS. Andere Arbeiten, bei denen *in organello*-Proteinbiosynthesen an GMS-Pflanzen durchgeführt wurden, sind nicht bekannt.

Die Fragestellung, ob die GMS-Gene beim Schnittlauch mit den Mitochondrien interagieren, kann nach den bisher durchgeführten Untersuchungen noch nicht endgültig beantwortet werden. Zunächst wäre es denkbar, daß die mitochondriale Translation gewebespezifisch in den Blüten beeinflusst wird (vergl. dazu 7.4.3). Da sich mit den in Kapitel 4 durchgeführten klassisch genetischen Analysen keine cytoplasmatischen Erbfaktoren nachweisen lassen, müßten die GMS-Gene in diesem Falle die Translation solcher mitochondrialer Gene beeinflussen, die in allen Cytoplasmatypen vorliegen. Eine andere denkbare Interaktion zwischen GMS-Genen und Mitochondrien besteht in der Annahme, daß die GMS-Gene nicht regulatorisch auf die mitochondriale Proteinbiosynthese wirken, sondern für Proteine kodieren, die am Aufbau der Mitochondrien beteiligt sind oder mit den mitochondrial kodierten Proteinen interagieren. Eine derartige Beeinflussung der Mitochondrien durch die GMS-Gene ist durch *in organello*-Proteinbiosynthesen nicht nachweisbar. Dazu müßten die mitochondrialen Gesamtproteine steriler und fertiler Pflanzen verglichen werden. Aufgrund der Vielzahl der zu detektierenden Proteine würde eine eindimensionale gelelektrophoretische Auftrennung nur unbefriedigende Ergebnisse ergeben. Deshalb ist für weiterführende Untersuchungen der mitochondrialen Gesamtproteine ein zweidimensionales Elektrophoreseverfahren einzusetzen. Dazu kann zunächst eine isoelektrische Fokussierung und anschließend nach Denaturierung mit SDS in der zweiten Dimension eine Auftrennung nach dem Molekular-

gewicht erfolgen. Eine andere Methode wurde von SCHÄGGER und VON JAGO (1991) entwickelt. Bei dieser Blue-Native-Gelelektrophorese werden zunächst die nativen mitochondrialen Komplexe aufgetrennt und anschließend nach Denaturierung die einzelnen Komponenten des jeweiligen Komplexes nach ihrer Größe. Diese Methode hat den Vorteil, das eventuell vorhandene Unterschiede einem Komplex zugeordnet werden können, und damit eine Aussage über die Funktion möglich ist.

7.4.3 Die Expression mitochondrial kodierter Proteine in cytoplasmatisch männlich sterilen und fertilen Pflanzen

Der Vergleich des mitochondrialen Translationsmusters des im Rahmen der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen Sterilitätscytoplasmas (5) mit zwei Normalcytoplasmen ergab, daß zwei Polypeptide in dem Sterilitätscytoplasma fehlen, während zwei andere zusätzlich gebildet werden. Da sich die Molekulargewichte jeweils eines fehlenden und eines zusätzlichen Polypeptids nur geringfügig unterscheiden, könnte es sich bei den zusätzlich gebildeten 16,8kDa- und 4,6kDa-Polypeptiden um abgewandelte Formen der 17,8kDa und 4,4kDa-Polypeptide der Normalcytoplasmen handeln. Insbesondere bei dem DCCD-bindenden Proteolipid kann davon ausgegangen werden, daß es sich um verschiedene Formen des gleichen Proteins handelt, da dieses fester Bestandteil im Translationsmuster der pflanzlichen Mitochondrien ist (LEAVER und GRAY 1982; HACK und LEAVER 1984; BOUTRY et al. 1984).

Bei dem neuen Sterilitätscytoplasma liegt demnach eine andere Situation als bei dem früher beschriebenen Sterilitätscytoplasma vor. Bei letzterem wird nach POTZ und TATLIOGLU (1993) ein zusätzliches 18kDa-Polypeptid gebildet, aber es fehlt kein anderes Protein im Vergleich zum Normalcytoplasma. Ob bei dem neuen Sterilitätscytoplasma eventuell gewebespezifisch in den Blüten ein weiteres Protein gebildet wird, konnte aufgrund der Verunreinigungen mit Bakterien nicht untersucht werden. Eine organspezifische Expression eines mitochondrialen Gens konnte im Laub im Vergleich zu den Wurzeln in Form eines 27kDa-Polypeptids nachgewiesen werden. Auch beim Mais (NEWTON und WALBOT 1985), der Zuckerrübe (LIND et al. 1991), *Nicotiana* (DE PAEPE et al. 1993) und der Petunie (CONLEY und HANSON 1994) wurden organ- bzw. gewebespezifisch exprimierte Polypeptide nachgewiesen. Ein mitochondriales Protein mit einem vergleichbaren Molekulargewicht zum 27kDa-Polypeptid vom Laub des Schnittlauchs wurde nicht beschrieben. Organ- bzw. gewebespezifische Translationsprodukte von CMS-Sequenzen sind nur bei *Phaseolus vulgaris* nachgewiesen worden. Die Transkripte des *orf239* der *pvs*-Sequenz werden in vegetativen und in generativen Geweben gefunden (CHASE 1994), während das Translationsprodukt nur im generativen Gewebe akkumuliert wird (ABAD et al. 1995). SARRIA et al. (1998) wiesen eine proteolytische Aktivität gegen das 27kDa-Polypeptid im vegetativen Gewebe nach, die zu einem raschen Abbau dieses Proteins führt. Bei allen übrigen untersuchten Pflanzenarten werden die CMS-spezifischen

Polypeptide konstitutiv exprimiert, so daß es eher unwahrscheinlich - wenn auch nicht auszuschließen - ist, daß bei dem neuen Sterilitätszytoplasma vom Schnittlauch eine weitere Veränderung im mitochondrialen Translationsmuster der Blüten vorhanden ist.

Die Tatsache, daß die im Vergleich zu den Normalcytoplasmen veränderten 16,8kDa und 4,6kDa-Polypeptide nicht durch das Restorer-gen *St2* beeinflusst werden (Abb. 7.2), könnte daran liegen, daß das *St2/st2*-Gen gewebespezifisch wirkt. Auch bei der Sonnenblume konnte zunächst kein Einfluß des Restorer-gens auf das CMS-spezifische 16kDa-Polypeptid festgestellt werden, obwohl dieses als das Translationsprodukt des *orfH522* (beschrieben in 3.4.3) identifiziert war (HORN et al. 1991; KÖHLER et al. 1991; LAVER et al. 1991). Erst Western-Blot Analysen ergaben, daß das CMS-spezifische Protein gewebespezifisch in den männlichen Blüten reduziert wird (SMART et al. 1994, MONÉGER et al. 1994). Bei dem 20kDa-Polypeptids des *orf138* des 'Ogura'-Cytoplasmas (beschrieben in 3.4.3) erfolgt eine Reduktion durch das Restorer-gen in Blüten und Laub, nicht aber in den Wurzeln (KRISHNASAMY und MAKAROFF 1994).

Neben Restorer-genen, die regulatorisch wirken, gibt es aber auch solche, die den Gehalt des jeweiligen CMS-Proteins nicht beeinflussen. Ein Beispiel dafür ist das Restorer-gen *Rf2* beim Mais (DEWEY et al. 1987; genauer beschrieben in Kapitel 8.4.2). Es wäre möglich, daß auch das *St2*-Gen beim Schnittlauch die Fertilität restoriert, ohne den Gehalt der beiden im Vergleich zu den Normalcytoplasmen veränderten Proteine zu beeinflussen.

7.4.4 Wie bewirken die CMS-spezifischen Veränderungen im mitochondrialen Translationsmuster die männliche Sterilität?

Obwohl die CMS-spezifischen Veränderungen im mitochondrialen Translationsmuster in den untersuchten Pflanzenarten nicht identisch sind, führen sie dennoch zu ähnlichen phänotypischen Erscheinungen. Vielfach wird diskutiert, daß die zusätzlichen Proteine eine unspezifische Störung der Atmungskette und damit der Zellenergiegewinnung bewirken, die nur bei dem erhöhten Energiebedarf während der Mikrosporogenese phänotypisch in Erscheinung tritt (z.B. MACKENZIE et al. 1994). Dagegen spricht jedoch, daß bei Messungen der Atmungsrate bei *Nicotiana* sp. (HAKANSSON et al. 1990) keine Unterschiede zwischen sterilen und fertilen Pflanzen nachgewiesen wurden.

Dennoch erscheint es wahrscheinlich, daß die Membranintegrität der Mitochondrien bei CMS-Pflanzen gestört ist, und daraus Unausgewogenheiten im Transport verschiedener Stoffwechselprodukte oder in der Aktivität der Enzymkomplexe resultieren. Allerdings ist in der Regel nicht bekannt, ob die beobachteten Veränderungen die Ursache der männlichen Sterilität oder Folgeerscheinungen eines anderen Prozesses sind, der die männliche Sterilität bedingt. Akkumulation oder Verarmung wurde bei einer Reihe von metabolischen Stoffen nachgewiesen, dazu zählen beispielsweise Aminosäuren (PEARSON 1981; PERL et al. 1992). In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, daß bei den *in*

organello-Synthesen beim Schnittlauch sehr häufig die fertilen Pflanzen eine geringere Inkorporation der radioaktiven Aminosäuren zeigten als die sterilen. Insbesondere gilt dies für die *wi*-GMS. Ob diese Beobachtung tatsächlich auf die sterilen Genotypen zurückgeführt werden kann, müßte durch eine exakte Quantifizierung überprüft werden.

Veränderungen in mitochondrialen Enzymaktivitäten wurden ebenfalls in verschiedenen CMS-Systemen nachgewiesen. Beispielsweise wird beim T-Cytoplasma vom Mais nach Behandlung mit dem T-Toxin keine Oxidase-Aktivität des alternativen Cyanid-insensitiven Elektronentransportwegs festgestellt (BEDNARSKI et al. 1977 in SANE et al. 1997), ähnliches gilt auch für das (S)- und das (C)-Cytoplasma (MUSGRAVE et al. 1986). Bei CMS-Pflanzen der Petunie ist der Transport über den alternativen Weg verringert (CONNETT und HANSON 1990). Bei *Sorghum* lassen sich im Gegensatz zu den oben genannten Beispielen keine Unterschiede in sterilen und fertilen Pflanzen bezüglich der Atmungsraten über den Cyanid-sensitiven und Cyanid-insensitiven Weg feststellen. Der Komplex I, II, III und IV und die alternative Oxidase scheinen für die Entstehung der CMS bei *Sorghum* nicht von Bedeutung zu sein, statt dessen wurden Unterschiede in den kinetischen Eigenschaften der ATPase der Antheren festgestellt. Während Maintainer und restorierte Pflanzen eine biphasische Kinetik zeigten, war diese Nicht-Linearität in der Kinetik bei sterilen Pflanzen stark herabgesetzt (SANE et al. 1997). Bei der Petunie könnte ebenfalls eine veränderte, zu hohe ATPase-Aktivität die Erschöpfung der Substrate zur Folge haben und dadurch die CMS bedingen (PERL et al. 1992). Eine ebenfalls nachgewiesene erhöhte Phosphohydrolase-Aktivität wird eher als Folge der Auflösungsprozesse in den Antheren angesehen (PERL et al. 1993).

Die Untersuchungen an *Sorghum* und der Petunie erhärten die in Kapitel 3 nach dem Vergleich verschiedener CMS-Sequenzen gefolgerte Annahme, daß der Komplex V (ATPase-Komplex) häufig grundlegend an der Entstehung von CMS beteiligt zu sein scheint. Dieser besteht im wesentlichen aus 2 Proteingruppierungen, dem F₀ und dem F₁-Bereich. Während der hydrophile F₁-Bereich aus kernkodierten Proteinen die enzymatische Aktivität der ATPase zeigt, fungiert der hydrophobe F₀-Bereich als Protonenkanal ohne eigene katalytische Aktivität. Letzterer setzt sich aus Untereinheiten zusammen, die in höheren Pflanzen mitochondrial kodiert sind: Die α -Untereinheit von dem *atpA*-Gen, das Produkt des *atp6*-Gens und das DCCD-bindende Proteolipid als Produkt des *atp9*-Gens (zusammengefaßt in HACK und LEAVER 1984). Interessanter Weise verringert die Bindung von Dicyclohexylcarbodiimid (DCCD) die geleelektrophoretische Mobilität des DCCD-bindenden Proteolipids, so daß dieses ein etwas höheres Molekulargewicht zu haben scheint (CATTELL et al. 1971 und SEBALD und HOPPE 1981 in HACK und LEAVER 1984). Gleichzeitig inhibiert die Bindung von DCCD die enzymatische Aktivität der ATPase. Das bei dem neuen Sterilitätszytoplasma (5) nachgewiesene größere Molekulargewicht des DCCD-bindenden Proteolipids im Vergleich zu den Normal-

cytoplasmen wirft die Frage auf, ob ein vergleichbarer Prozeß zu einer verminderten ATPase-Aktivität führt und so die männliche Sterilität bedingt. Dies wäre eine einzigartige Situation, da ein "ursprünglich vorhandenes" Protein mit bekannter Funktion und nicht ein neu entstandenes Protein chimärer Natur zur CMS führt. Die weitere Charakterisierung dieses Proteins ist sehr gut möglich, da es stark exprimiert wird und durch die Bindung von ^{14}C -DCCD markiert werden kann. In organischen Gemischen (Butanol- oder Chloroform-Methanol) löst sich das Proteolipid und kann auf diese Weise von den übrigen Proteinen getrennt und folglich aufgereinigt werden.

Eine Besonderheit bei der Betrachtung der Funktion von CMS-spezifischen Proteinen stellt wiederum das CMS-System von *Phaseolus vulgaris* dar. Bei diesem System kommt es zur Einlagerung des CMS-spezifischen Polypeptids in die Kallosewand der Pollenmutterzellen (ABAD et al. 1995), während die bereits erwähnte proteolytische Aktivität gegen dieses Protein einen schnellen Abbau im vegetativen Gewebe bedingt (SARRIA et al. 1998). Die gewebespezifische Anreicherung und auch der Transport aus den Mitochondrien ist für kein anderes CMS-Protein berichtet worden. Nach Transformation des *orf139* der *pvs*-Sequenz (beschrieben in 3.4.3) in das Kerngenom von Tabakpflanzen konnte ebenfalls männliche Sterilität erzeugt werden, unabhängig davon, ob der *orf139* mit einer mitochondrialen Zielsequenz versehen war oder nicht. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die CMS in *Phaseolus vulgaris* nicht direkt von der Funktion der Mitochondrien abhängt (HE et al. 1996).

Nach Transformation des *orf224* des 'Polima'-Cytoplasmas (beschrieben in 3.4.3) in fertile Rapspflanzen wurde ebenfalls bei einigen Regeneraten Sterilität erzeugt, allerdings nur dann, wenn die Konstrukte mit mitochondrialen Zielsequenzen versehen waren. Demnach zeigt hier das CMS-spezifische Protein nur dann seine Wirkung, wenn es in die Mitochondrien gelangt. Interessanter Weise waren bei mehreren Transformanten morphologische Veränderungen betreffend der Organidentität der Antheren zu beobachten, eine phänotypische Ausprägung, die nicht dem natürlichen Phänotyp der 'Polima'-CMS entspricht (BROWN et al. 1998).

In anderen Ansätzen wurde das *urf13*-Gen vom T-Mais in Tabak und das *pcf*-Gen in Tabak und in fertile Petunien transformiert. In beiden Fällen waren die Konstrukte mit Zielsequenzen versehen, die einen Transport der Proteine in die Mitochondrien gewährleisten (CHAUMONT et al. 1995; WINTZ et al. 1995). Dennoch wurde keine Sterilität ausgeprägt. Die Autoren und auch die Autoren späterer Publikationen (SCHNABLE und WISE 1998) diskutieren, daß wahrscheinlich die Expression zum richtigen Zeitpunkt der Entwicklung nicht gewährleistet ist, oder die Proteine nicht an ihren natürlichen Wirkort transportiert werden. Dies würde auf sehr spezifische Effekte der Proteine in ihren ursprünglichen Systemen hinweisen. Allerdings ist nicht zwangsläufig zu erwarten, daß mitochondriale CMS-Sequenzen in Verbindung mit völlig anderen Kerngenomen

automatisch Sterilität bedingen. Beispielsweise sind die alloplasmatisch entstandenen CMS-Systeme ein Beweis dafür, daß Mitochondriengenome in Verbindung mit dem Kerngenom von einer Art zu fertilen Pflanzen führen können, in Verbindung mit dem Kerngenom einer anderen Art dagegen Sterilität bedingen.

8 Grundlegende Arbeiten zur Isolierung des Temperatur-sensitiven Restorergens *T*

8.1 Einleitung

Wie in den vorangegangenen Kapiteln deutlich geworden ist, werden die molekularen Grundlagen der CMS nur dann besser verstanden werden, wenn es gelingt, die Funktion der Veränderungen im mitochondrialen Genom und der mitochondrialen Translationsprodukte besser zu charakterisieren und die Interaktionen zwischen den Organellen und dem Kerngenom, im engeren Sinne der Mitochondrien und der Restorerogene, zu entschlüsseln. Dazu ist es notwendig, in verschiedenen CMS-Systemen die beteiligten Gene zu isolieren, um Aussagen über ihre Wirkungsweise machen zu können.

Zwar ist die stabile Ausprägung der CMS bei dem Saatgutelter Voraussetzung für eine erfolgreiche Hybridsaatgutproduktion, nicht minder wichtig ist aber auch die vollständige Restoration in der Hybride, wenn Samen oder Früchte genutzt werden sollen. Dies hat das Beispiel der Roggensorte 'Farino' (vergl. Kapitel 1) in diesem Jahr erneut deutlich unter Beweis gestellt. Da der Schnittlauch bis heute die einzige Pflanzenart ist, bei der eine Temperaturreaktion von CMS-Pflanzen durch den Nachweis des Temperatur-sensitiven Restorergens (*T/t*) genetisch erklärt werden konnte (TATLIOGLU 1987), erscheint es sinnvoll, sich bei der Isolierung eines Restorergens bei dieser Pflanzenart auf das *T*-Gen zu konzentrieren.

In der vorliegenden Arbeit wird zur Isolierung des *T*-Gens eine Strategie verfolgt, die eine optimale Nutzung der Vorteile des vorhandenen Materials erlaubt. Aufgrund der Perennierfähigkeit und leichten Verklonbarkeit des Schnittlauchs konnten Genotypen selektiert und vegetativ vermehrt werden, deren Klonteile bei hohen (konstant 24°C) und normalen (20°/12°C, Tag/Nacht) Temperaturen kultiviert werden können. Durch diese Variation ist es möglich, das Temperatur-sensitive Restorergen im Gegensatz zu anderen Restorergenen an- bzw. auszuschalten. Dies soll zur Isolierung des Gens genutzt werden, indem die Unterschiede im Transkriptmuster durch eine "Differential Display Reverse Transcription -PCR" (DDRT-PCR, erstmalig von LIANG und PARDEE 1992 beschrieben) sichtbar gemacht werden. Die Methode basiert auf der Überlegung, daß jedes mRNA-Molekül durch reverse Transkription und anschließende PCR-Amplifikation darstellbar ist. Dabei sind die Primer so gewählt, daß letztlich die gesamte mRNA revers transkribiert wird, und die Visualisierung der entstehenden cDNA-Fragmente durch eine Aufteilung in verschiedene Reaktionen als distinkte Banden nach Polyacrylamid-Gelelektrophorese

möglich ist (LIANG et al. 1993; BAUER et al. 1993a,b). Da Klonteile des selben Genotyps verwendet werden, sind nur Unterschiede bei den Produkten solcher Gene zu erwarten, die durch die Variation der Temperaturstufen an- bzw. ausgeschaltet worden sind. Der Nachweis der DDRT-PCR Fragmente wird mittels Silberfärbung durchgeführt. Für diese nichtradioaktive Detektion wurde von LOHMANN et al. (1995) der Begriff REN-Display ("Rapid and Efficient Method for Nonradioactive Differential Display") geprägt. Die Autoren arbeiteten mit Hydrazellen. Das nichtradioaktive Nachweisverfahren in Verbindung mit der DDRT-PCR wurde bei Pflanzen in der vorliegenden Arbeit erstmalig angewendet.

8.2 Material und Methoden

8.2.1 Pflanzenmaterial

Für die Isolierung der RNA wurden Klonteile von CMS-Pflanzen einer Nachkommenschaft, die bereits mehrere Jahre erhalten und vegetativ vermehrt worden war, bei den Temperaturstufen 20°/12°C und 24°/24°C (Tag/Nacht) zur Blüte gebracht. Zur weiteren Charakterisierung der Genotypen erfolgte in einer separaten Kabine eine Tetracyclinbehandlung von Klonteilen mit 500ppm Tetracyclin 2x wöchentlich bei 20°/12°C (vergl. Kapitel 5). Mit der Variation der Temperaturstufen und der Tetracyclinbehandlung wurde begonnen, als die ersten Knospen sichtbar wurden. Die Behandlungen wurden bis nach der Ernte des Pflanzenmaterials fortgesetzt. Die Boniturwerte der Einzelpflanzen sind in der Tabelle 11.6 im Anhang dargestellt.

Nach der Bonitur der ersten geöffneten Blüten wurden die noch geschlossenen Knospen für die RNA-Isolierung entnommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Aufarbeitung bei -80°C gelagert. Gleichzeitig wurde auch junges Laub geerntet und eingelagert. Da nach SCHNEIDER und TATLIOGLU (1996a) der Einfluß des Temperatur-sensitiven Restorergens auf das CMS-spezifische 18kDa-Polypeptid auch im Laub nachweisbar ist, wurden sowohl Knospen als auch Blätter der Pflanze 6025/28, einem Temperatur-sensitiven und Tetracyclin-insensitiven Genotyp, (S) *xx tt A.*, getrennt zur RNA-Isolierung und dem sich anschließenden Differential Display eingesetzt.

8.2.2 RNA-Isolierung

Die Gesamt-RNA wurde aus den jungen Blütenknospen mit dem RNeasy Plant Kit (Fa. Qiagen) isoliert. Um verbliebene Kontaminationen mit DNA zu entfernen, wurden jeweils 150µg der RNA für 60min bei 25°C mit 60 units DNase I (Fa. Gibco-BRL) und 200 units RNase OUT (Fa. Gibco BRL) inkubiert. Der Reaktionsmix mit einem Endvolumen von 100µl enthielt 50mM Tris-HCl (pH 8.3), 75mM KCl und 3mM MgCl₂. Nach dem Abbau der DNA erfolgte eine Extraktion mit dem gleichen Volumen

Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1) (Zentrifugation: 15min bei 5000xg). Der Überstand wurde erneut mit einem Volumen Chloroform extrahiert, für 15min bei 5000xg zentrifugiert und die RNA aus dem Überstand mit einem Volumen Isopropanol und 0.1 Volumen 3M Natriumacetat über Nacht bei -20°C gefällt. Durch Zentrifugation für 30min bei 13000xg wurde die RNA pelletiert, in 70% Ethanol gewaschen und erneut für 5min bei 13000xg zentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde im Vakuum getrocknet und in Wasser resuspendiert. Die Bestimmung des RNA-Gehalts erfolgte über die Extinktionsmessung bei 260nm (SAMBROOK et al. 1989).

Verwendete Chemikalien:

- RNeasy Plant Kit (Fa. Quiagen).
- Enzyme:
 - DNase I (Fa. Gibco-BRL)
 - RNase OUT (Fa. Gibco BRL).
- Puffer und Reaktionsmische:
 - wurden aus den mitgelieferten Pufferlösungen für die Enzyme zusammengestellt.
- Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1), Chloroform, Isopropanol, 3M Natriumacetat, 70%iges Ethanol (v/v).

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

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

Wie in Abbildung 8.1 dargestellt, werden die 12 cDNA Untergruppen anschließend mit dem gleichen Anker-Primer und jeweils einem von 26 verschiedenen Dekamer upstream-Primern in einer PCR amplifiziert (U1-U26; BAUER et al. 1993a,b). Der gleiche methodische Ansatz mit einem nichtradioaktiven Nachweis der DDRT-PCR-Fragmente wurde von LOHMANN et al. (1995) an Hydra-Zellen beschrieben und als REN-Display ("Rapid and Efficient Method for Nonradioactive Differential Display") bezeichnet.

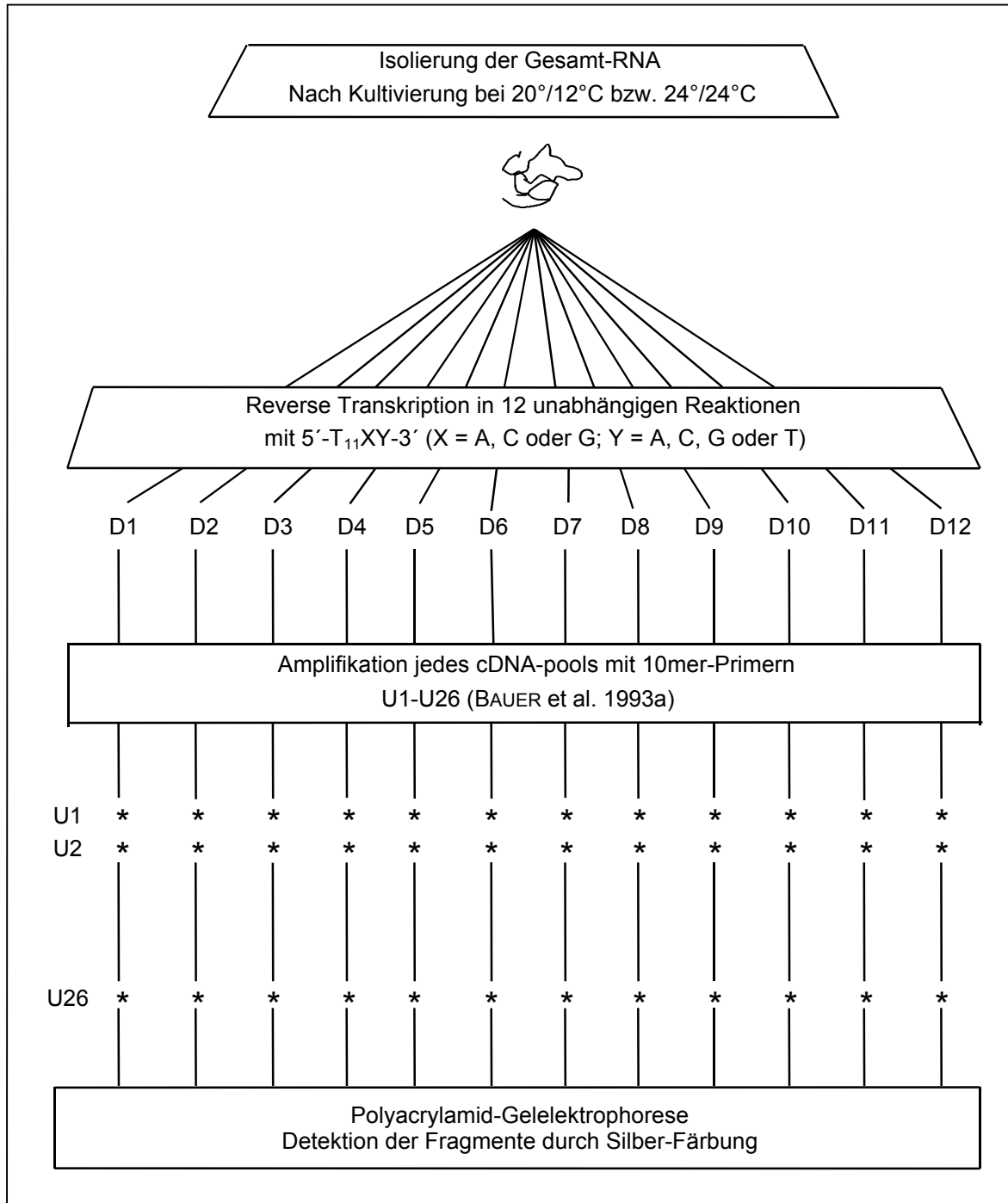


Abb. 8.1: Schema zur Erklärung einer nichtradioaktiven DDRT-PCR (REN-Display).

Zur reversen Transkription wurden 0,5µg der DNA-freien Gesamt-RNA mit 2,5µM Anker-Primer (D1-D12, Fa. Biometra) für 10 min bei 70°C in einem Volumen von 16µl inkubiert und auf Eis abgekühlt. Anschließend wurde das Endvolumen von 40µl erreicht, durch Zugabe von dNTPs (Endkonzentration: 25µM, jedes), DTT (10µM), Tris-HCl, pH 8,3 (50mM), KCl (75mM), MgCl₂ (3mM), 80 units RNase OUT (Fa. Gibco BRL) und 400 units Reverstranskriptase (Superscript II, Fa. Gibco-BRL). Vor Zugabe der Reverstranskriptase erfolgte eine Inkubation für 2min bei 40°C. Die cDNA-Synthese dauerte 1h bei

40°C, anschließend wurde der Mix für 5min auf 98°C erhitzt. Die cDNA wurde durch Zugabe von 20µl Wasser auf ein Endvolumen von 60µl verdünnt.

Für die Differential Display – PCR wurden 2µl der cDNA in einem Reaktionsvolumen von 20µl eingesetzt. Der Ansatz enthielt 2,5µM downstream-Primer (D1-D12, entsprechend der reversen Transkription), 2,5µM des jeweiligen Dekamer upstream-Primers (U1-U26), 150µM dNTP (jedes), 1,5mM MgCl₂, 10mM Tris-HCl, pH 8,8, 50mM KCl und 0,1% Triton X-100 und 1 unit Dynazyme (Fa. Biometra). Die PCR erfolgte in einem Gerät der Fa. Hybaid (TouchDown mit Deckelheizung) für 45 Cyklen mit 10sec bei 94°C zur Denaturierung, 1min bei 40°C für das "annealing" und 30sec bei 72°C zur Extension. Als Kontrolle wurde bei der vorangegangenen reversen Transkription der RNA in cDNA von jeder Probe ein Ansatz ohne reverse Transkriptase durchgeführt. Da bei der PCR dieser Kontrollen nur einige schwache Banden amplifiziert wurden, die außerdem in den Probenansätzen nicht zu detektieren waren, kann davon ausgegangen werden, daß die RNA nicht mit DNA verunreinigt war. Weiterhin wurde bei der PCR eine Kontrolle ohne Zugabe von cDNA durchgeführt, um Verunreinigungen der Komponenten des PCR-Ansatzes ausschließen zu können.

Verwendete Chemikalien:

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

8.2.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

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

Verwendete Chemikalien:

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

8.2.5 Visualisierung der Fragmente durch Silberfärbung

Die Visualisierung der Fragmente mittels Silberfärbung erfolgte nach einem abgeänderten Protokoll von BASSAM et al. (1991). Die Gele wurden dazu für 45min bei 50°C in 500ml einer Ethanol-Essigsäurelösung fixiert, 3x für jeweils 10min in H₂O dest. gewaschen, für

45min in 400ml Silberlösung gefärbt, mit H₂Odest. abgespült und für 6-10min entwickelt (400ml Entwickler). Anschließend wurden die Gele für jeweils 20min in 500ml Stopbad und in 500ml Glycerinlösung imprägniert, bevor sie an der Luft für 2 Tage getrocknet wurden. Zum Schutz erfolgte dann eine Abdeckung mit Folie.

Verwendete Chemikalien:

- Fixierer:

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

- Silberlösung:

- 0,1% (w/v) AgNO₃
- frisch dazu geben: 400µl Formaldehyd (37%) pro 400ml Lösung.

- Entwickler:

- 2,5% (w/v) Na₂CO₃
- frisch dazu geben: 400µl Formaldehyd (37%) pro 400ml Lösung.
- frisch dazu geben: 400µl einer 2%igen (w/v) Natrium-Thiosulfatlösung
- Anmerkung: Die Natrium-Thiosulfatlösung sollte nicht länger als 1 Woche bei 4°C gelagert werden. Die notwendige Menge, um den Entwickler optimal einzustellen, kann mit einem Tropfentest ermittelt werden. Wird zu 50µl Silberlösung das gleiche Volumen Entwickler ohne Natrium-Thiosulfat gegeben, erfolgt in 2-4sec ein gleichmäßiger Farbumschlag des Tropfens zu Dunkelbraun. Ist der Entwickler mit einer optimalen Menge Natrium-Thiosulfat versetzt, dauert der Farbumschlag etwa doppelt so lange, und es bilden sich schwarze Schlieren vor einem sonst ungefärbten Hintergrund. Die Schale mit dem Entwickler sollte vorgekühlt werden, um die Hintergrundfärbung der Gele zu minimieren.

8.2.6 Reamplifikation und Klonierung polymorpher Fragmente

Zur Reamplifikation der polymorphen Fragmente wurden diese mit einem Skalpell aus den Gelen geschnitten, zerkleinert und in 20µl H₂Odest. über Nacht rehydriert. Anschließend erfolgte eine Erhitzung für 5min auf 95°C und nach Zerkleinerung des Polyacrylamid-gelstückes nochmals für 3-4min. Nach Zentrifugation für 5min bei 13000xg wurden 0,1-2µl der gelösten cDNA für einen Reamplifikationsansatz eingesetzt. Die übrigen Komponenten dieses 20µl-Ansatzes entsprachen denen der Differential-Display-PCR (siehe 8.2.3). Das Temperaturprotokoll wurde zur Erhöhung der Spezifität in ein "touch-down"-Protokoll abgeändert: 10 Zyklen (94°C 10sec, 50°C 1min, 72°C 30sec) und 35 Zyklen mit Herabsetzung der "annealing-Temperatur" um 0,25°C pro Zyklus von 50°C bis 41,25°C.

Zur Klonierung der Fragmente wurden doppelte Reamplifikationsansätze durchgeführt. Da neben den erwarteten noch einige weitere Fragmente amplifiziert wurden, erfolgte eine Auftrennung in einem 2%igem Agarose-Gel (low melting small DNA, Fa. Biozym) in 1xTAE. Dem Gel waren 0,1µl Ethidiumbromid pro ml-Gellösung zugesetzt. Als Molekulargewichtsmarker diente eine 100bp-Leiter (Fa. Pharmacia). Der Ladepuffer wurde mit OrangeG eingefärbt, da Bromphenolblau eine ähnliche Mobilität wie die Fragmente besitzt, und deren Ethidiumbromidfärbung unter UV-Licht bei Verwendung von Bromphenolblau folglich schlecht erkennbar ist. Die Fragmente mit der richtigen Größe wurden mit einem Skalpell aus den Gelen geschnitten, in 1x Gelase-Puffer (Fa.

Epicentre Technologie) eingestellt, für 3min bei 70°C geschmolzen und nach Abkühlung auf 45°C für 1h mit Gelase inkubiert. (Gelasemenge laut Herstellerangabe: Fa. Epicentre Technologie). Die cDNA-Fragmente wurden vor der Ligation mit dem StrataPrep™ PCR Purification Kit (Fa. Stratagene) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Das erhaltene Volumen wurde von 50µl auf 10µl im Vakuum eingengt. Die Enden der Fragmente wurden für die anschließende "blunt-end"-Klonierung poliert. Das "polishing" erfolgte mittels der *Pfu*-DNA-Polymerase der Fa. Stratagene nach Angaben des Herstellers. Zur Bestimmung der Konzentration wurden nach dem "polishing" 5µl des Ansatzes neben eine Verdünnungsreihe von λ-DNA auf ein 2%iges Agarosegel mit 0,1µl Ethidiumbromid pro ml-Gellösung aufgetragen. Die Ligation und Klonierung erfolgte mit dem PCR-Script™ AMP Cloning Kit (Fa. Stratagene) nach Angaben des Herstellers. Die Selektion der transformierten Bakterien erfolgte wie in Kapitel 3.2.4 beschrieben.

Verwendete Chemikalien:

- für die Reamplifikations-PCR-Ansätze wie in 8.2.3.
- Low melting small DNA - Agarose (Fa. Biozym)
 - Ethidiumbromid
 - 100bp-Leiter (Fa. Pharmacia)
 - Orange G-Ladepuffer (30% Glycerin, 0,25% Orange G)
 - 1xTAE wie in 3.2.2.
- Gelase mit Puffer (Fa. Epicentre Technologie).
- StrataPrep™ PCR Purification Kit (Fa. Stratagene).
- Verdünnungsreihe von λ-DNA
 - 40, 60, 80, 100, 150, 200, 250ng.
- PCR-Script™ AMP Cloning Kit (Fa. Stratagene).
- Medien zur Anzucht der Bakterien siehe Kapitel 3.2.4.

8.3 Ergebnisse

8.3.1 Nachweis differentiell exprimierter mRNAs eines Temperatur-sensitiven Genotyps unter normalen und hohen Temperaturbedingungen durch DDRT-PCR

Mit Hilfe der DDRT-PCR konnten pro Primerkombination (insgesamt 12x26) im Mittel etwa 50 Fragmente ausgewertet werden. Im vegetativen Gewebe wurden zwischen den Temperaturstufen weniger polymorphe Banden nachgewiesen als im generativen. Dies war zu erwarten, da davon ausgegangen werden kann, daß in den Knospen der restorierten Pflanzen (bei 24°/24°C) neben dem *T*-Gen zusätzliche Gene der Antheren- und Mikrosporenentwicklung angeschaltet werden, deren Transkripte bei den sterilen Pflanzen (bei 20°/12°C) fehlen. In Abb. 8.2 sind Bandenmuster nach Amplifikation mit den Primerkombinationen D2/U18 und D2/U19 gezeigt, bei denen zusätzlich amplifizierte Banden im Laub und in den Knospen bei 24°/24°C aufgetreten sind.

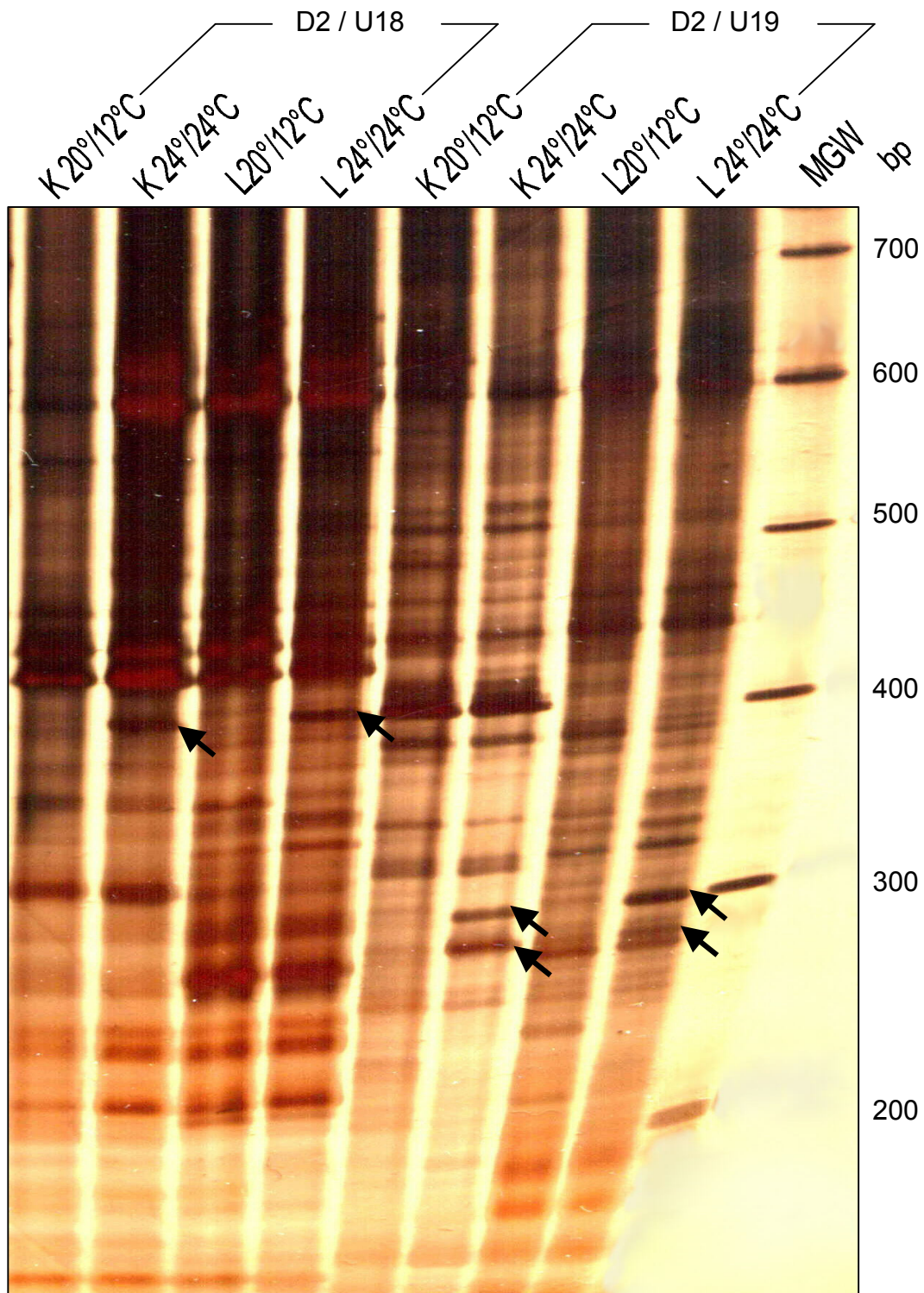


Abb. 8.2: Ausschnitt aus einem DDRT-PCR Gel.

Die Pfeile markieren zusätzlich amplifizierte Fragmente bei den Knospen (K) und beim Laub (L) des bei 24°/24°C restorierten Klonteils im Vergleich zu dem bei 20°/12°C sterilen Klonteil (Primerkombinationen: D2/U18, D2/U19).

In der Tabelle 8.1 ist eine Übersicht gegeben, die die Anzahl eindeutig zusätzlich vorhandener Banden in den 12 cDNA-Pools zeigt. Die Größe der amplifizierten Fragmente beträgt 200-1000bp. Kleinere Fragmente wurden nicht berücksichtigt, da die

Wahrscheinlichkeit, daß es sich um Artefakte handeln könnte, mit abnehmender Fragmentgröße steigt, und eine spätere Korrelation dieser kleinen Fragmente mit dem *T*-Gen in Southern- und Northern-Hybridisierungen methodisch bedingt schwierig erscheint.

Tab. 8.1: Anzahl der cDNA-Fragmente bei den Temperaturstufen 20°/12°C bzw. 24°/24°C (Tag/Nacht), die entweder in den Knospen oder dem Laub, bzw. in beiden Organen als zusätzliche Banden in der DDRT-PCR nachgewiesen wurden

cDNA-Pool	nur in den Knospen		nur im Laub		in Knospen und Laub	
	20°/12°C	24°/24°C	20°/12°C	24°/24°C	20°/12°C	24°/24°C
1	1	4	-	2	-	1
2	-	-	-	1	-	3
3	1	4	-	-	-	1
4	-	8	-	1	-	2
5	2	4	-	-	-	4
6	1	3	2	1	-	6
7	1	2	-	1	-	-
8	-	9	-	-	-	2
9	1	1	-	2	2	4
10	-	-	-	-	-	2
11	-	-	-	-	1	1
12	-	-	-	-	-	1
Summe	7	35	2	8	4	27

Da der Einfluß des *T*-Gens auf das CMS-spezifische 18kDa-Protein der Mitochondrien im Laub nachgewiesen wurde (SCHNEIDER und TATLIOGLU 1996a), ist davon auszugehen, daß das *T*-Gen in beiden Organen, also im Laub und in den Knospen, exprimiert wird. Die weiteren Arbeiten werden sich folglich auf die cDNA-Fragmente der letzten Spalte in Tabelle 8.1 konzentrieren. Die Fragmente wurden reamplifiziert und kloniert und stehen für Southern- und Northern-Hybridisierungen zur Verfügung, mit denen im Anschluß an die vorliegende Arbeit eine Korrelation mit dem *T*-Gen erfolgen wird. Wie diese Korrelation durchgeführt werden sollte, ist in Abschnitt 8.4.1 dargestellt.

8.4 Diskussion

8.4.1 Der methodische Ansatz

Die DDRT-PCR bietet besonders bei Differenzierungs- und Dedifferenzierungsprozessen eine gute Möglichkeit, die für diese Prozesse wichtigen Genfunktionen zu erfassen. Sie wurde erstmalig zur Anwendung in der Tumorforschung beschrieben (LIANG und PARDEE 1992), bietet aber auch andere interessante Möglichkeiten, beispielsweise zur Aufklärung der somatischen Embryogenese, Kallusbildung und Regeneration von Pflanzen. Weiterhin können Reaktionen von Pflanzen auf wechselnde Umweltbedingungen erfaßt werden, beispielsweise auch Abwehrreaktionen gegen Pathogenbefall. Der wichtigste methodische Vorteil besteht darin, daß eine Gensequenz vorher nicht bekannt sein muß, wodurch Gene von bisher unbekanntem Reaktionsweg isoliert werden können. Dies ist bei Strategien

zur Genisolierung, die bereits bekannte Sequenzen nutzen (Homologie-Ansätze), nicht zu erwarten. Markergestützte Strategien zur Genisolierung ("Map-based cloning") haben den Nachteil, daß die ausgewerteten Polymorphismen in der Regel unspezifisch sind. Da bei dieser Strategie mittels einer Kopplungsanalyse die Distanz zum interessierenden Gen errechnet werden muß, kann die Isolierung des Gens nur erfolgen, wenn eine dichtbesetzte Kopplungskarte der Pflanzenart vorliegt. Der Vorteil der DDRT-PCR gegenüber der markergestützten Strategie besteht darin, daß spezifische Effekte nachgewiesen werden können, die auf Unterschieden im Transkriptionsmuster beruhen. Die Tatsache, daß dabei sowohl Induktion als auch Repression erfaßt werden, ist besonders dann von Vorteil, wenn nicht bekannt ist, ob beispielsweise eine Behandlung zum An- oder zum Abschalten bestimmter Gene führt. Durch die PCR-Reaktion ist es möglich, auch schwach exprimierte Gene und quantitative Effekte zu erfassen. Die Voraussetzung dafür ist aber, die PCR-Bedingungen so zu optimieren, daß möglichst viele Fragmente amplifiziert werden, und eine klare Auswertung der Gele dennoch möglich ist. Zur Optimierung der PCR-Bedingungen (Zusammensetzung des Reaktionsmixes und der Temperaturstufen) wurden in der vorliegenden Arbeit "Taguchi-Methoden" eingesetzt, die von COBB und CLARKSON (1994) zur Anwendung bei PCR-Reaktionen beschrieben wurden. Das Prinzip besteht darin, die zu variierenden Komponenten in ihren verschiedenen Stufen in einem orthogonalen System anzuordnen und aus dem "Ertrag" jeder Reaktion den Effekt jeder Komponente in ihren Stufen zu schätzen. Bei der Ermittlung des "Ertrags" der PCR-Reaktionen wurde die Anzahl amplifizierter Fragmente, deren Größe und der Hintergrund berücksichtigt. Die DDRT-PCR konnte so optimiert werden, daß eine Auswertung mittels Silberfärbung der Fragmente möglich war.

Die weiterhin durchzuführenden Arbeiten werden sich auf die Korrelation der in der DDRT-PCR nachgewiesenen polymorphen Fragmente mit dem *T*-Gen konzentrieren. Dazu wird zunächst eine RFLP-Analyse durchgeführt, bei der die cDNA-Fragmente als Sonden in Southern-Hybridisierungen an restringierter DNA von definierten *T/t*-Genotypen eingesetzt werden. Können mit den Fragmenten Polymorphismen nachgewiesen werden, müßten diese die *T/t*-Genotypen unterscheiden, wenn das cDNA-Fragment tatsächlich einen Teil des *T*-Gens repräsentiert. Im Anschluß kann dieser indirekte Nachweis des *T*-Gens durch ein Ausschlußverfahren mittels Transkriptanalysen (Northern-Hybridisierungen und Reverse-Transkriptions-PCR) bestätigt werden. Um auszuschließen, daß die isolierten Sequenzen von anderen Temperatur-induzierten Genen stammen, werden dazu Temperatur-sensitive, (S)*xxT*., und -insensitive, (S)*xxtt*, Pflanzen, die unter beiden Temperaturbedingungen (20°C/12°C und 24/24°C) kultiviert wurden, verglichen. Damit können eventuell vorhandene zusätzliche Gene, deren Transkription durch höhere Temperaturen induziert wird, vom *T*-Gen unterschieden werden, da diese nicht mit den definierten *T*-Genotypen zu korrelieren sein werden (Tabelle 8.2 a und b). Um weiterhin auszuschließen, daß dem *T*-Gen nachgeschaltete Gene der Antherenentwicklung isoliert

werden, soll ein Vergleich mit fertilen Pflanzen erfolgen, bei denen das *T*-Gen rezessiv vorliegt oder durch normale Temperaturbedingungen (20°/12°C) nicht transkribiert wird. Bei diesen Genotypen (mit Maintainer-Cytoplasmen) sind alle direkt an der Antherenentwicklung beteiligten Gene angeschaltet, Transkripte des *T*-Gens dürfen sich aber nicht nachweisen lassen. Es können dazu auch Tetracyclin-sensitive CMS-Genotypen herangezogen werden, bei denen die Fertilität durch Tetracyclinapplikation wieder hergestellt ist (Tabelle 8.2 a und c). In Tabelle 8.2 sind die Genotypen und ihre Kultivierungstemperaturen zusammengefaßt, die eine Korrelation der DDRT-Fragmente mit dem *T*-Gen ermöglichen.

Tab. 8.2: Schematische Darstellung der Expressionsanalyse als Ausschlußverfahren zur Korrelation der in der DDRT-PCR nachgewiesenen Fragmente mit dem *T*-Gen

das zu korrelierende cDNA-Fragment repräsentiert	DDRT-PCR - Ergebnis:		Unterscheidung anderer Gene vom <i>T</i> -Gen:	
	(S) <i>xx TT</i> 24°/24°C fertil	(S) <i>xx TT</i> 20°/12°C steril	(S) <i>xx tt</i> 24°/24°C steril	(N) .. oder (S) <i>xx aa</i> + Tetracyclin 20°/12°C fertil
a) das <i>T</i> -Gen	+	-	-	-
b) andere Temperatur-induzierte Gene	+	-	+	-
c) nachgeschaltete Gene der Antheren- und Mikrosporenentwicklung	+	-	-	+

+ = DDRT-PCR-Fragment weist Expression nach

- = DDRT-PCR-Fragment weist keine Expression nach.

Anmerkung: Da die DDRT-PCR-Fragmente auch im Laub nachgewiesen wurden, ist nicht davon auszugehen, daß die Fragmente auf die unter c) aufgeführten Gene zurückgehen.

Mit den so korrelierten Fragmenten des *T*-Gens wird dann ein PCR-gestütztes Screening nach dem vollständigen cDNA-Klon durchgeführt. Die cDNA-Bank kann bei ihrer Erstellung durch Verwendung des downstream-Primers, der in der DDRT-PCR die Amplifikation des korrelierenden Fragments ermöglicht hat, angereichert werden.

8.4.2 Die Wirkungsweise von Restorer genen in verschiedenen CMS-Systemen

Restorer gene stellen die Fertilität wieder her, indem sie in der Regel sporophytische Defekte beheben, daß heißt sie wirken vor der Meiose der Pollenmutterzellen oder im sporophytischen Gewebe. In wenigen Ausnahmen können Restorer gene aber auch gametophytisch wirken. Von den Pollen einer heterozygoten Pflanze sind in diesem Falle nur die Hälfte funktionsfähig. Ein Beispiel für ein CMS-System, bei dem eine gametophytische Restoration erfolgt, ist das (S)-Cytoplasma mit dem Restorer gen *Rf3* beim Mais (KAMPS et al. 1996). Ein anderes Beispiel für ein "Gametophytisches Zwei-Gen-System" sind die Restorer gene *Rf3* und *Rf4* der *Sorghum*-Linie IS1112C (TANG et al. 1998).

Die Wirkungsweisen von Restorer genen lassen sich in zwei Hauptgruppen unterteilen: Bei der Mehrzahl der untersuchten Pflanzenarten wirken die Restorer gene regulatorisch auf die

mitochondriale Transkription oder Translation der CMS-Sequenzen. Dabei kann die Synthese der mitochondrialen Proteine während der ganzen Entwicklungsphase der Pflanze, wie z. B. bei dem 25kDa-Polypeptid der Petunie unterdrückt werden (NIVISON und HANSON 1989) oder die Reduktion ist auf bestimmte Organe beschränkt, wie bei dem 20kDa-Polypeptid des *orf138* des 'Ogura'-Cytoplasmas, bei dem eine Reduktion nur in den Blüten und dem Laub, nicht aber in den Wurzeln erfolgt (KRISHNASAMY und MAKAROFF 1994). Bei dem 16kDa-Polypeptid der Sonnenblume erfolgt die Reduktion gewebespezifisch nur in den Antheren (MONÉGER et al. 1994).

In einigen Fällen konnte gezeigt werden, daß die in den jeweiligen CMS-Systemen wirkenden Restorerogene nicht die Transkription direkt regulieren, sondern erst in die Prozessierung der mitochondrialen Transkripte eingreifen. Dies gilt bei den zwei unabhängig voneinander wirkenden Restorerogenen *Rfp1* und *Rfp2* des 'Polima'-Cytoplasmas vom Raps (SINGH und BROWN 1991), dem *Rf1*-Gen vom T-Mais (KENNELL und PRING 1989; WISE et al. 1996) und dem *Rf3*-Gen in der *Sorghum*-Linie IS1112C (TANG et al. 1998). Durch Editierung der Transkripte (hauptsächlich dem Austausch von Cytosin durch Uracil) könnten neue Start- (AUG) und Stop-Codons (UAA, UAG, UGA) gebildet, das Splicen der Introns verhindert, oder die Funktion der CMS-spezifischen Polypeptide durch den Austausch von Aminosäuren reguliert werden (SCHNABLE und WISE 1998). Bei dem *Rf3*-Gen in der *Sorghum*-Linie IS1112C scheint die Editierung der Transkripte die Voraussetzung für die anschließende Prozessierung durch das Restorerogen zu sein (PRING et al. 1998). Auch bei einem CMS-System vom Reis (Chinsurah Boro-II) wird die Editierung und die anschließende Prozessierung der Transkripte in Verbindung mit der Fertilitätsrestoration diskutiert (IWABUCHI et al. 1993; AKAGI et al. 1994).

Neben Restorerogenen, die regulatorisch wirken, gibt es eine zweite Gruppe, die den Gehalt des jeweiligen CMS-Proteins nicht beeinflussen. Ein Beispiel dafür ist das Restorerogen *Rf2* beim Mais. Dieses Gen steht in komplementärer Wirkung zum *Rf1*-Gen (LAUGHNAN und GABAY-LAUGHNAN 1983), beeinflußt die Expression des CMS-spezifischen mitochondrialen 13kDa Proteins aber im Gegensatz zu diesem nicht (DEWEY et al. 1987). Bisher ist das Restorerogen *Rf2* vom Mais das einzige, dessen Isolierung mittels "transposon-tagging" gelungen ist. Dieses Gen zeigt eine 70%ige Sequenzhomologie zu mitochondrialen Aldehyddehydrogenasen der Säugetiere (CUI et al. 1996). Aufgrund dieser Tatsache wurden zwei Hypothesen formuliert: Nach der Metabolie-Hypothese verändert das CMS-spezifische 13kDa-Polypeptid die mitochondriale Funktion in der Weise, daß zusätzliche Aldehyde gebildet werden. In diesem Falle würde das *Rf2*-Gen die Aldehyde entgiften oder sie zu Komponenten oxidieren, die für die Funktion der Mitochondrien notwendig sind. Nach der Interaktions-Hypothese interagiert das *Rf2*-Genprodukt direkt oder indirekt mit dem 13kDa-Polypeptid, so daß dieses seine störende Funktion verliert. Beispielsweise könnten Aldehydkomponenten der inneren Mitochondrienmembran oxidiert werden, und

dadurch die Akkumulation des 13kDa-Polypeptids oder dessen störende Funktion verhindern (CUI et al. 1996, SCHNABLE und WISE 1998). Es wäre auch denkbar, daß der früher postulierte X-Faktor, also die Substanz, die in den Antheren in ähnlicher Weise mit dem 13kDa-Polypeptid interagieren könnte wie das T-Toxin, ein Aldehyd ist (vergl. 7.1; LEVINGS 1996). Die verschiedenen Hypothesen machen deutlich, daß auch nach der Isolierung des *Rf2*-Gens der Mechanismus, der zur Restoration beim T-Cytoplasma vom Mais führt, bisher nicht geklärt werden konnte. Erschwerend für die molekulare Aufklärung kommt hinzu, daß das *Rf2*-Gen nur in komplementärer Wirkung mit dem *Rf1*-Gen zur Restoration führt (siehe oben). Komplementäre Genwirkungen liegen auch bei der Restoration verschiedener CMS-Plasmen der Sonnenblume vor (zusammengefaßt in HORN und FRIEDT 1997), beispielsweise bei dem in Kapitel 3.4.3 beschriebenen Pet1-Cytoplasma (KINMAN 1970).

Eine Sonderstellung nimmt das bereits in Kapitel 6.4.6 beschriebene Restorerger *Fr* bei *Phaseolus vulgaris* ein, das die *pvs*-Sequenz aus dem mitochondrialen Genom der Megasporen eliminiert (MACKENZIE und CHASE 1990; HE et al. 1995). Das Restorerger wirkt intermediär, daß heißt heterozygote Pflanzen sind semisteril (HE et al. 1995). Ein weiteres Restorerger, *Fr2*, das posttranskriptional die Expression der *pvs*-Sequenz vermindert (CHASE 1994), verhindert gleichzeitig die Elimination der Sequenz durch das *Fr*-Restorerger (HE et al. 1995). Ein ähnlich wirkendes Gen, das letztlich eine permanente Restoration eines Sterilitätscytoplasmas bewirkt (MACKENZIE und BASSETT 1987), ist nicht bekannt. Einzig in den Sterilitätscytoplasmen 9E und A4 von *Sorghum* gibt es noch Hinweise, daß möglicherweise rezessive Kerngene existieren, die zu einer Veränderung des Mitochondriengenoms führen, so daß die sterilitätsbedingende Wirkung verloren geht (ELKONIN et al. 1998). Im CMS-S-System vom Mais beeinflußt der Kernhintergrund indirekt die Häufigkeit, mit der Revertanten auftreten, indem ein Einfluß des Kernhintergrunds auf das Vorkommen bestimmter Episome besteht (ESCOTE-CARLSON et al. 1988, 1990). Die Reversion zur Fertilität entsteht durch Rekombination dieser Episome mit homologen Bereichen der CMS-induzierenden Sequenz (vergl. Kapitel 3.4.3; ZABALA et al. 1997).

Der Überblick zeigt deutlich, daß es sicherlich verschiedene Möglichkeiten gibt, wie Kerngene die mitochondrialen CMS-Sequenzen beeinflussen können und somit zur Fertilitätsrestoration führen. Dennoch ist es möglich, daß bestimmte Gemeinsamkeiten bestehen. In diesem Zusammenhang ist besonders interessant, daß Kartierungen bei verschiedenen Pflanzenarten ergeben haben, daß verschiedene Restorerger gekoppelt vorliegen können. Beispielsweise wurde bei *Brassica napus* nachgewiesen, daß das *Rfp/rfp*-Restorerger des 'Polima'-Cytoplasmas in Repulsion gekoppelt mit einem *Mmt/mmt*-Gen ("modifier of mitochondrial transcripts") vorliegt, welches im dominanten Zustand Transkripte anderer mitochondrialer Gene beeinflußt (SINGH et al. 1996). Dieses

Gen ist wiederum genetisch nicht vom *Rfn*-Restorer gen des 'Nap'-Cytoplasmas zu unterscheiden. Ob es sich um Allele eines Gens, oder um eng gekoppelte Gene handelt, ist nicht geklärt. Der Locus, der die Restorer gene beider CMS-Systeme umfaßt, wird mit *Rf*-Locus bezeichnet (BROWN et al. 1998). Bei *Phaseolus vulgaris* wurden zwei neue Restorer gene identifiziert, die in der Kopplungskarte nicht von dem *Fr2*-Gen zu unterscheiden waren, und folglich Allele oder eng gekoppelte Loci sind. Auch das *Fr*-Gen befindet sich auf der gleichen Kopplungsgruppe (JIA et al. 1997). Beim Roggen wurde das Restorer gen *Rfg1* für die 'Gülzow' (G) CMS an gleicher Stelle kartiert wie das Restorer gen für die 'Pampa' (P) CMS, so daß wahrscheinlich Allele eines Gens vorliegen. Die Stelle der Kartierung entspricht dem Segment von Chromosom 4RL, das homeolog zum 6S Chromosom von anderen Triticaceae ist. Roggenadditionslinien mit diesem Segment restorieren ebenfalls in hexaploidem Weizen die CMS des Cytoplasmas von *T. timopheevi* (Restorer gen *Rfc4*). Es wird diskutiert, daß dazu noch zwei weitere Restorer gene dieses Systems homeolog sein könnten (zusammengefaßt in BÖRNER et al. 1998).

8.4.3 Die Fertilitätsrestoration in den CMS-Systemen verschiedener *Allium*-Arten

Die Gattung *Allium* beinhaltet wirtschaftlich bedeutende Arten, bei denen die Aufklärung der molekularen Prozesse der CMS sowohl Bedeutung für die praktische Züchtung hat, als auch gute Möglichkeiten für das grundlegende Verständnis der Interaktion zwischen Kerngenom und Mitochondrien bietet. Insbesondere erscheint ein Vergleich von solchen Restorer genen interessant, die unabhängig voneinander zur Restoration im gleichen CMS-System führen. Dies ist beim Schnittlauch möglich, durch das umweltstabile Restorer gen *X*, das Temperatur-sensitive Restorer gen *T* und das unvollständig wirkende Restorer gen *a*, welches die Tetracyclin-Sensitivität der CMS bedingt. Gelingt die Isolierung des *T*-Gens kann ein Vergleich zu den anderen im gleichen CMS-System involvierten Kerngenen erfolgen. Von den vom *T*-Gen gewonnenen Sequenzinformationen können Primer abgeleitet werden, mit denen Genotypen untersucht werden, die sich am Restorerlocus *X/x* bzw. bezüglich des Tetracyclingens *A/a* unterscheiden. Handelt es sich bei den drei in diesem CMS-System involvierten Kerngenen um Mitglieder einer Genfamilie, so müßten sich beim Vergleich der angesprochenen Genotypen Sequenzen dieser Gene mit den vom *T*-Gen abgeleiteten Primern amplifizieren lassen.

Aber auch bei verschiedenen CMS-Systemen innerhalb der gleichen Art und mit nahe verwandten Arten könnte ein solcher Vergleich hinsichtlich der Evolution der CMS neue Erkenntnisse bringen. In diese Analysen kann auch das *st2*-Gen, also das Restorer gen des neuen CMS-Systems eingeschlossen werden. Besonders interessant erscheint auch ein Vergleich des CMS-Systems vom Schnittlauch mit dem CMS-S-System der Zwiebel. Die folgenden Hinweise deuten darauf hin, daß die Systeme in beiden Arten die gleichen molekularen Grundlagen haben könnten:

- Das Restorergergen der Zwiebel muß schon früh in der Evolution mit beiden Allelen vorgelegen haben:

Die genetische Kontrolle des Systems bei der Zwiebel wurde bereits 1943 durch JONES und CLARKE weitgehend charakterisiert. Die Autoren wiesen nach, daß die Sterilität auf einen cytoplasmatischen Faktor (S) zurückzuführen ist, und die Fertilität durch das Gen *Ms/ms* im dominanten Zustand restoriert wird. Da das rezessive Allel in den meisten Zwiebelpopulationen und auch bei Schalotten auftritt, kann angenommen werden, daß diese Mutation schon früh in der Evolution von *Allium cepa* aufgetreten sein muß (LITTLE et al. 1944; DAVIS 1957).

- Das (S)-Cytoplasma der Zwiebel ist wahrscheinlich alloplasmatischer Herkunft:

Die Annahme, daß das (S)-Cytoplasma der Zwiebel alloplasmatischer Herkunft sein könnte, also aus einer unbekanntem Art in die Zwiebel eingelagert wurde, beruht hauptsächlich auf Untersuchungen des Chloroplastengenoms: Bestimmte Restriktionsfragmente des (S)-Cytoplasmas konnten weder in anderen Cytoplasmen der Zwiebel noch in einer nah verwandten Art gefunden werden. Hingegen ließen sich diese Fragmente in einer triploiden viviparen Zwiebelhybride ('Pran') unbekanntem Ursprungs nachweisen (HAVEY 1993). Bei dem Vergleich von mitochondrialen Restriktionsfragmenten und nach Southern-Hybridisierungen mit mitochondrialen Sonden konnte das (S)-Cytoplasma eindeutig vom (N)-Cytoplasma unterschieden werden (DE COURCEL et al. 1989; HOLFORD et al. 1991b).

Neben dem (S) und dem Normalcytoplasma (N) wurde eine zweite CMS, (T)-Cytoplasma, identifiziert (BERNINGER 1965), bei der die Restoration entweder durch das dominante Allel am Locus *A/a* oder durch die komplementäre Wirkung der dominanten Allele an den Loci *B/b* und *C/c* kontrolliert wird (SCHWEISGUTH 1973). Eine eindeutige Unterscheidung des (N)- und des (T)-Cytoplasmas bezüglich der mitochondrialen Genomorganisation ist bisher nicht gelungen. Beide Cytoplasmen wurden von DE COURCEL et al. (1989) zu einer Gruppe (M) zusammengefaßt, in der sich zwar einige Unterschiede im Restriktionsfragmentmuster der mitochondrialen DNA finden ließen, eine eindeutige Zuordnung bestimmter Fragmente zu einem der beiden Cytoplasmatypen ist aber nicht möglich (HOLFORD et al. 1991b). Auch das Chloroplastengenom von (T) und (N)- Cytoplasma ließ sich nicht unterscheiden, so daß hier wahrscheinlich eine autoplasmatische Mutation zur Entstehung des Sterilitäts-cytoplasmas geführt hat (DE COURCEL et al. 1989; HOLFORD 1991b; HAVEY 1993).

- CMS-Genotypen der Zwiebel zeigen eine Förderung der Fertilität in ähnlichen Temperaturbereichen wie beim Schnittlauch:

Untersuchungen von VAN DER MEER und VAN BENNEKOM (1969) ergaben, daß manche Zwiebelpopulationen bei 14°C weitgehend steril waren, bei 20-23°C jedoch viel weniger sterile Pflanzen auftraten, also ähnliche Temperaturbereiche, die auch beim

Schnittlauch zum Ab- bzw. Anschalten des *T*-Gens führen und somit die Ausprägung der Sterilität bzw. Fertilität bedingen. Die genetischen Grundlagen des Temperatureinflusses auf die Ausprägung der CMS bei der Zwiebel sind bisher nicht bekannt.

- Ähnlicher Mikrosporogeneseverlauf der CMS-Pflanzen beider Systeme:
Die Mikrosporogenese verläuft bei beiden Arten in vergleichbarer Form bis zum Tetradenstadium normal, kommt dann zum Stillstand, während sich das Tapetum in verschiedener Weise weiterentwickelt: Entweder erfolgt frühzeitige Degeneration, die Reduktion bleibt ganz aus, oder es beginnt ein hypertrophiertes Wachstum (Zwiebel: HOLFORD et al. 1991a, Schnittlauch: HÜLSMANN, pers. Mitteilung; vergl. Kapitel 2)

Der Vergleich der CMS-Systeme von Zwiebel und Schnittlauch wird Aufschluß darüber geben, ob der Prozeß der Fertilitätsrestoration innerhalb eines CMS-Systems und im Vergleich zu anderen Systemen nur von bestimmten Genfamilien hervorgerufen wird, oder ob eine Vielzahl verschiedener molekularer Wege zur Aufhebung der CMS führen können.

Die molekularen Grundlagen der männlichen Sterilität beim Knoblauch (*A. sativum*) sind ebenfalls nicht hinreichend untersucht worden. Eine züchterische Bearbeitung ist nur über Mutationsinduktion möglich, da nur einige wenige Klone bekannt sind, bei denen es zur Entwicklung befruchtungsfähiger Pollen kommt (ETOH 1996). Der Knoblauch wird folglich nur vegetativ vermehrt. Untersuchungen von KONVICKA et al. (1978), bei denen eine Antibiotika-Behandlung die Fertilität bei Knoblauchpflanzen förderte, können nach den am Schnittlauch gewonnenen Kenntnissen über die fertilitätsfördernde Wirkung des Tetracyclins als Hinweis gewertet werden, daß die männliche Sterilität beim Knoblauch cytoplasmatisch bedingt sein könnte. Als die Untersuchungen von KONVICKA et al. (1978) durchgeführt wurden, war noch nicht bekannt, daß die Mitochondrien Erbträger der CMS sind, und so wurde dieser Effekt mit einer eventuellen Reduzierung rickettsienähnlicher Organismen begründet. Aufgrund der heute vorliegenden Kenntnisse über die fertilitätsfördernde Wirkung des Tetracyclins, sollten derartige Untersuchungen noch einmal durchgeführt und gegebenenfalls neu interpretiert werden. Auch das Vorkommen verschiedener Abnormitäten der Blütenentwicklung beim Knoblauch, von Brutzwiebelbildungen bis hin zu weitgehend normalen Blütenformen, könnte ein Hinweis auf Veränderungen der mitochondrialen Genomorganisation sein. Solche in Kapitel 2 erläuterten Umbildungen von Blütenorganen ("homeotic-like mutants") konnten bei *Nicotiana* mit Umstrukturierungen im mitochondrialen Genom korreliert werden. Auch die bei dem petaloiden CMS-System von *Daucus carota* auftretenden Veränderungen der Antheren stellen eine derartige Umwandlung in eine andere Organidentität dar. Sollte sich zeigen, daß die männliche Sterilität beim Knoblauch tatsächlich durch cytoplasmatische Effekte hervorgerufen wird, stellt sich weiterhin die Frage, ob eine Restoration möglich ist. Die Isolierung und molekulare Charakterisierung von Restorergenen in anderen Arten, vor allem in den nahe verwandten, wird darauf vielleicht eine Antwort geben können.

9 Zusammenfassung

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, durch Anwendung klassisch genetischer und molekularer Methoden verschiedene männliche Sterilitätsformen beim Schnittlauch (*Allium schoenoprasum* L.) zu charakterisieren. Die Ergebnisse sollen sowohl der praktischen Pflanzenzüchtung dienen, als auch die Kenntnisse über die molekularen Grundlagen der männlichen Sterilität erweitern.

Nach der Beschreibung cytologischer Untersuchungen an den bearbeiteten Sterilitätsformen *wi*, *st1* und *st2*, wurden zunächst Cytoplasmotypen charakterisiert, die sich bezüglich der Organisation ihrer mitochondrialen Gene unterscheiden. Mittels der dazu durchgeführten RFLP-Analyse mit heterologen mitochondrialen Gensonden konnten neben dem Sterilitätscytoplasma des bekannten CMS-Systems vier weitere Cytoplasmotypen differenziert werden.

Nach einem detaillierten Vergleich von CMS-spezifischen mitochondrialen Gensequenzen aus verschiedenen Pflanzenarten wurde eine mögliche Rolle der Gene des F1-F0-ATPase Komplexes bei der Entstehung dieser Sequenzen diskutiert. Danach scheint insbesondere das *atp9*-Gen eine "hot-spot"-Region für Rekombinationsereignisse zu sein, die zur Bildung von CMS-Sequenzen führen können.

Nachdem der monogen rezessive Erbgang der drei Sterilitäten *wi*, *st1* und *st2* in ihren Ursprungcytoplasmen bestätigt worden war, erfolgte eine klassisch genetische Analyse zum Nachweis eventuell vorhandener cytoplasmatischer Erbfaktoren. Nach Einlagerung der Gene *wi* und *st1* in drei von ihrem Ursprungcytoplasma verschiedene Cytoplasmotypen konnte auch hier die Ausprägung der Sterilität bonitiert werden. Folglich kann ein spezifischer Erbfaktor des Ursprungcytoplasmas bei diesen Sterilitäten ausgeschlossen werden, so daß es sich um GMS-Formen handelt. Bei der *st2*-Sterilität wurde hingegen ein solcher cytoplasmatischer Erbfaktor nachgewiesen, der zur Ausprägung der Sterilität notwendig ist. Durch reziproke Kreuzungen und Selektion von Maintainern konnte verifiziert werden, daß ein neues CMS-System vorliegt. Das *St2/st2*-Gen ist demnach ein dominantes Restorer-gen. Temperatur- und Tetracyclinversuche ergaben, daß beide GMS-Gene und auch die neue CMS eine stabile Ausprägung der Sterilität zeigen. Bei den untersuchten Pflanzen mit dem neuen Sterilitätscytoplasma konnte durch Bestimmung des Blütezeitpunktes eine schnellere Entwicklungsfähigkeit und damit Frühzeitigkeit nachgewiesen werden. Die Frage, ob dieses Merkmal tatsächlich von dem Cytoplasmotyp vererbt wird, wurde diskutiert.

Weiterhin wurden in den Nachkommenschaften neue Sterilitäten selektiert, deren Vererbung bereits teilweise geklärt werden konnte. Bei einer dieser Sterilitäten muß nach den bisher durchgeführten Untersuchungen ein monogen rezessiver Erbgang angenommen werden (Gen *B/b*). Temperaturreaktionen dieser Sterilität weisen auf zwei zusätzliche, modifizierende Gene (*Y/y* und *Z/z*) mit komplementärer Wirkung hin. Eine weitere Sterilitätsform wird nur bei gleichzeitigem Vorliegen zweier rezessiver Gene (*M/m* und *N/n*) ausgeprägt. Folglich wird bei dieser Sterilität eine gleichsinnig monarchiale Genwirkung angenommen.

Die Nutzungsmöglichkeit von CMS- und GMS-Systemen für die Herstellung von Hybrid-saatgut wurden insbesondere unter dem Aspekt der Stabilität ihrer Ausprägung diskutiert.

Die Konstanz der maternalen Vererbung der Mitochondrien wurde mittels RFLP-Analyse bestätigt. Die mitochondriale Genomorganisation wird von den GMS-Genen *Wi/wi* und *St1/st1*, sowie von dem Restorer-gen *X/x* des früher beschriebenen CMS-Systems und dem Restorer-gen *St2/st2* nicht beeinflußt.

Durch *in organello*-Proteinbiosynthesen von *in vitro*-vermehrtem Pflanzenmaterial wurden bei dem neuen Sterilitätscytoplasma zwei mitochondrial kodierte Polypeptide nachgewiesen, die sich in ihrer gelelektrophoretischen Mobilität von denen der Normalcytoplasmen unterscheiden. Eines dieser Proteine kann aufgrund der charakteristischen Expression im niederen Molekulargewichtsbereich als das Produkt des *atp9*-Gens angenommen werden. Weder das Restorer-gen *St2/st2* noch das *Wi/wi*-Gen beeinflußt die Menge eines der mitochondrial kodierten Proteine im Laub oder in den Wurzeln. Im Laub wurde ein gewebespezifisch exprimiertes Polypeptid nachgewiesen, das im mitochondrialen Translationsmuster der Wurzeln fehlt. Mögliche Wirkungsweisen CMS-spezifischer Veränderungen im Translationsmuster der Mitochondrien wurden diskutiert.

Weiterhin wurden grundlegende Arbeiten zur Isolierung des Temperatur-sensitiven Restorer-gens *T* durchgeführt, welches bei dem früher beschriebenen CMS-System nur unter hohen Temperaturen die Fertilität wiederherstellt. Nach Etablierung eines nichtradioaktiven Differential Display (DDRT-PCR, REN-Display) wurden mRNAs nachgewiesen, die bei Klonteilen eines Temperatur-sensitiven Genotyps im Laub und in den Knospen bei normalen bzw. hohen Temperaturen differentiell exprimiert werden. Die weiterhin durchzuführenden Arbeiten zur Korrelation dieser cDNA Fragmente mit dem *T*-Gen werden beschrieben.

10 Literatur

- ABAD, A.R., B.J. MERTHENS UND S.A. MACKENZIE, 1995: Specific expression in reproductive tissues and fate of a mitochondrial sterility-associated protein in cytoplasmic male-sterile bean. *The Plant Cell* 7: 271-285.
- AHOKAS, H., 1982: Cytoplasmic male sterility in barley: evidence for the involvement of cytokinins in fertility restoration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 7605-7608.
- AINSWORTH, C., J. PARKER UND V. BUCHANAN-WOLLASTON, 1998: Sex Determination in Plants. *Curr. Topic. Develop. Biol.* 38: 167-223.
- AKAGI, H., M. SAKAMOTO, C. SHINJO, H. SHIMADA UND T. FUJIMURA, 1994: A unique sequence located downstream from rice mitochondrial *atp6* may cause male sterility. *Curr. Genet.* 25: 52-58.
- ANDRÉ, C., A. LEVY UND V. WALBOT, 1992: Small repeated sequences and the structure of plant mitochondrial genomes. *Trends Genet.* 8: 128-132.
- ATSMON, D. UND C. TABBAK, 1979: Comparative effects of gibberelline, silver nitrate and aminoethoxyvinyl glycine on sexual tendency and ethylene evolution in cucumber plant (*Cucumis sativus* L.). *Plant Cell Physiol.* 20: 1547-1555.
- BAILEY-SERRES, J., D.K. HANSON, T.D. FOX UND C.J. LEAVER, 1986: Mitochondrial genome rearrangement leads to extension and relocation of the cytochrome c oxidase subunit I gene in sorghum. *Cell* 47: 567-576.
- BANNEROT, H., L. BOULIDARD UND Y. CHUPEAU, 1977: Unexpected difficulties met with radish cytoplasm in *Brassica oleracea*. *Eucarpia Cruciferae Newslett.* 2: 16.
- BANNEROT, H., L. BOULIDARD, Y. CAUDERON UND J. TEMPE, 1974: Cytoplasmic male sterility transfer from *Raphanus* to *Brassica*. *Proceedings of the Eucarpia Meeting, Crop Section Cruciferae* 25: 52-54.
- BAR, M. UND R. FRANKEL, 1993: Pleiotropic effects of male sterility genes in hybrid tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Euphytica* 69: 149-154.
- BASSAM, B.J., G. CAETANO-ANOLLES UND P. GRESSHOFF, 1991: Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 196: 80-83.
- BAUER, D., H. MÜLLER, J. REICH, H. RIEDEL, V. AHRENKIEL, P. WARTHOE UND M. STRAUSS 1993a: Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique. *Nucl. Acids Res.* 21: 18.
- BAUER, D., H. MÜLLER, J. REICH, H. RIEDEL, V. AHRENKIEL, P. WARTHOE UND M. STRAUSS, 1993b: Differential Display Reverse Transcription PCR. *Bio.Tech.* 2: 32-35.
- BAUR, E., 1909: Das Wesen und die Erblichkeitsverhältnisse der "Varietates albomarginatae hort" von *Pelargonium zonale*. *Zschr. Indukt. Abstamm. Vererb. Lehre* 1: 330-351.
- BELCOUR, L., O. BENDEL UND M. PICARD, 1991: A site specific deletion in mitochondrial DNA of *Podospora* is under the control of nuclear genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 3579-3583.

- BELLIARD, G., G. PELLETIER, F. VEDEL UND F. QUETIER, 1978: Morphological characteristics and chloroplast DNA distribution in different cytoplasmic parasexuell hybrids of *Nicotiana tabacum*. Mol. Gen. Genet. 165: 231-237.
- BENDICH, A.J. UND S.B. SMITH, 1990: Moving pictures and pulsed-field gel electrophoresis show linear DNA molecules from chloroplast and mitochondria. Curr. Genet. 17: 421-425.
- BENTZEN, P., D. COOK, D. DENTI, A. HARRIS, J. HOFMAN UND J.M. WRIGHT, 1990: One tube DNA extraction procedure for molecular fingerprinting. Fingerprint News 2: 17-21.
- BERNINGER, E., 1965: Contribution à l'étude de la sterilité mâle de l'oignon (*Allium cepa* L.) Ann. Amélior. Plant. 15: 183-199.
- BERNARDI, G. UND G. BERNARDI, 1986: Compositional constraints and genome evolution. J. Mol. Evol. 24:1-11.
- BERTRAM, S. UND H.G. GASSEN, 1991: Gentechnische Methoden. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- BONHOMME, S., F. BUDAR, D. LANCELIN, I. SMALL, M.-C. DEFRANCE UND G. PELLETIER, 1992: Sequence and transcript analysis of the *Nco*2,5 Ogura-specific fragment correlated with cytoplasmic male sterility in *Brassica* cybrids. Mol. Gen. Genet. 235: 340-348.
- BORGES, F.O.L., 1987: Diallel analysis of maize resistance to sorghum downy mildew. Crop Sci. 27: 178-180.
- BÖRNER, A., V. KORZUN, A. POLLEY, S. MALYSHEV UND G. MELZ, 1998: Genetics and molecular mapping of a male fertility restoration locus (*Rfg1*) in rye (*Secale cereale* L.). Theor. Appl. Genet. 97: 99-102.
- BOUTRY, M., A.M. FABER, M. CHARBONNIER UND M. BRIQUET, 1984: Microanalysis of mitochondrial protein synthesis products. Plant Mol. Biol. 3: 445-452.
- BRANDENBERGER, L.P., T.E. MORELOCK UND J.C. CORRELL, 1992: Evaluation of Spinach Germplasm for Resistance to a New Race (Race 4) of *Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae*. Hort. Sci. 27: 1118-1119.
- BREWSTER, J.L., 1994: Onions and other vegetable Alliums. Crop Prod. Sci. Hort. 3: Seite 44.
- BROWN, G.G., M. DOMAJ, M. DUPAUW, M. JEAN, X.Q. LI UND B.S. LANDRY, 1998: Molecular analysis of *Brassica* CMS and its application to hybrid seed production. Acta Hort. 459: 265-274.
- CAPORALI, E., A. CARBONI, M.G. GALLI, G. RESSI, A. SPADA UND G.P.M. LONGO 1994: Development of male and female flower in *Asparagus officinalis*. Search for point of transition from hermaphroditic to unisexual development pathway. Sex. Plant Reprod. 7: 239-249.
- CAVALIER-SMITH, T., 1980: How selfish is DNA? *news and views*. Nature 285: 617.
- CHARLESWORTH, B., 1991: The evolution of sex chromosomes. Science 251: 1030-1033.
- CHARLESWORTH, B. UND D. CHARLESWORTH, 1978a: A model for the evolution of dioecy and gynodioecy. Am. Nat. 112: 975-997.
- CHARLESWORTH, B. UND D. CHARLESWORTH, 1978b: Population genetics of partial male sterility and the evolution of monoecy and dioecy. Heredity 41: 137-153.

- CHARLESWORTH, D. UND B. CHARLESWORTH, 1987: The effect of investment in attractive structures on allocation to male and female function in plants. *Evolution* 41: 948-968.
- CHASE, C.D., 1994: Expression of CMS-unique and flanking mitochondrial DNA sequences in *Phaseolus vulgaris* L. *Curr. Genet.* 25: 245-251.
- CHASE, C.D. UND V.M. ORTEGA, 1992: Organization of *atpA* coding and 3'flanking sequences associated with cytoplasmic male sterility in *Phaseolus vulgaris* L. *Curr. Genet.* 22: 147-153.
- CHAUMONT, F., B. BERNIER, R. BUXANT, M.E. WILLIAMS UND C.S. LEVINGSIII, 1995: Targeting the maize T-*urf13* product into tobacco mitochondria confers methomyl specificity to mitochondrial respiration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 1167-1171.
- CHERNYSHEVA, G. UND Z.B. SHAMINA, 1991: Effect of cytoplasmic male sterility on induction of maize embryonic callus tissue. *So. Genet.* 26: 944-947.
- CHÉTRIT, P., R. RIOS, R. DE PAEPE, V. VITARD, S. GUTIERRES UND F. VEDEL, 1992: Cytoplasmic male sterility is associated with large deletions in the mitochondrial DNA of two *Nicotiana glauca* protoclones. *Curr. Genet.* 21: 131-137.
- CLARK, E.M., S. IZHAR UND M.R. HANSON, 1985: Independent segregation of the plastid genome and cytoplasmic male sterility in *Petunia* somatic hybrids. *Mol. Gen. Genet.* 199: 440-445.
- COBB, D. UND M. CARKSON, 1994: A simple procedure for optimising the polymerase chain reaction (PCR) using modified Taguchi methods. *Nucleic. Acids Res.* 22: 3801-3805.
- COEN, E.S. UND E.M. MEYEROWITZ, 1991: The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* 353: 31-37.
- COEN, E.S., J.M. ROMERO, S. DOYLE, R. ELLIOT, G. MURPHY UND R. CARPENTER, 1990: *Floricaula*: A homeotic gene required for flower development in *Antirrhinum majus*. *Cell* 63: 1311-1322.
- CONLEY, C.A. UND M.R. HANSON, 1994: Tissue specific protein expression in plant mitochondria. *Plant Cell* 6: 85-91.
- CONNETT, M.B., 1987: Mechanisms of maternal inheritance of plastids and mitochondria: development and ultrastructural evidence. *Plant Mol. Biol. Rep.* 4: 193-205.
- CONNETT, M.B. UND M.R. HANSON, 1990: Differential mitochondrial electron transport through the cyanide-sensitive and cyanide-insensitive pathways in isonuclear lines of cytoplasmic male sterile, male fertile, and restored *Petunia*. *Plant Physiol.* 93: 1634-1640.
- CORRIVEAU, J.L. UND A.W. COLEMAN, 1988: Cytological evidence for maternal inheritance of plastid DNA in the genus *Glycine* subgenera *Glycine* and *Soja*. *Soybean. Genet. Newsl.* 15: 89-92.
- COVELLO, P.S. UND M.W. GRAY, 1992: Silent mitochondrial and active nuclear genes for subunit 2 of cytochrome c oxidase (*coxII*) in soybean: evidence for RNA-mediated gene transfer. *EMBO J.* 11: 3815-3820.
- CUI, X., R.P. WISE UND P.S. SCHNABLE, 1996: The *rf2* nuclear restorer gene of male-sterile T-cytoplasm maize. *Science* 272: 1334-1336.

- DAVIS, E.W., 1957: The distribution of the male sterility gene in onion. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 70: 316-318.
- DE BOTH, G., 1995: SeedlingTM technology. Proceedings of the 9th International Congress, Cambridge, U.K. 4-7 July 1995, 6-8.
- DE COURCEL, A.G.L., F. VEDEL UND J.M. BOUSSAC, 1989: DNA polymorphism in *Allium cepa* cytoplasm and its implications concerning the origin of onions. *Theor. Appl. Genet.* 77: 793-798.
- DE PAEPE, R., P. CHÉRIT, V. VITARD, F. AMBARD-BRETTEVILLE, D. PRAT UND F. VEDEL, 1990: Several nuclear genes control both male sterility and mitochondrial protein synthesis in *Nicotiana sylvestris* protoclones. *Mol. Gen. Genet.* 222: 206-210.
- DELLAPORTA, S.L. UND A. CALDERON-URREA, 1993: Sex determination in flowering plants. *Plant Cell* 5: 1241-1251.
- DELOURME, R., N. FOISSET, R. HORVAIS, P. BARRET, G. CHAMPAGNE, W.Y. CHEUNG, B.S. LANDRY UND M. RENARD, 1998: Characterisation of the radish introgression carrying the *Rfo* restorer gene for the Ogu-INRA cytoplasmic male sterility in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Theor. Appl. Genet* 97: 129-134.
- DEWEY, R.E., D.H. TIMOTHY UND C.S. LEVINGS III, 1991: Chimeric mitochondrial genes expressed in the C male-sterile cytoplasm of maize. *Curr. Genet.* 20: 475-482.
- DEWEY, R.E., D.H. TIMOTHY UND C.S. LEVINGS III, 1987: A mitochondrial protein associated with cytoplasmic male sterility in the T cytoplasm of maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 5374-5378.
- DEWEY, R.E., C.S. LEVINGS III UND D.H. TIMOTHY, 1986: Novel recombinations in the maize mitochondrial genome produce a unique transcriptional unit in the Texas male-sterile cytoplasm. *Cell* 44: 439-449.
- DEWEY, R.E., J.N. SIEDOW, D.H. TIMOTHY UND C.S. LEVINGS III, 1988: A 13 kilodalton maize mitochondrial protein in *E. coli* confers sensitivity to *Bipolaris maydis* toxin. *Science* 239: 293-295.
- DICKSON, M.H., 1970: A Temperature Sensitive Male Sterile Gene in Broccoli, *Brassica oleracea* L. var. *Italica*. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 95: 13-14.
- DIXON, A.G.O., P.J. BRAMEL-COX UND T.L. HARVEY, 1990: Diallel analysis of resistance in sorghum to greenbug Biotype E: antibiosis and tolerance. *Crop Sci.* 30: 1055-1059.
- Ekiz, H. und C.F. Konzak, 1991: Nuclear and cytoplasmic control of anther culture response in wheat. III. Common wheat crosses. *Crop Sci.* 31: 1432-1436.
- ELKONIN, L.A., V.V. KOZHEMYAKIN UND A.G. ISHIN, 1998: Nuclear-cytoplasmic interaction in restoration of male fertility in the '9E' und A4 CMS-inducing cytoplasm of sorghum. *Theor. Appl. Genet.* 97: 626-632.
- ENGELKE, T. UND T. TATLIOGLU, 1998: Nachweis eines cytoplasmatischen Erbfaktors bei der *st2*-Sterilität in *Allium schoenoprasum*. *Vortr. Pflanzenzüchtg.* 42: 195-197.
- ENGELKE, T., UND T. TATLIOGLU, 1996a: Ansätze zur molekularen Charakterisierung der genischen männlichen Sterilität (GMS) sowie der Reversion der cytoplasmatischen männlichen Sterilität (CMS) bei *Allium schoenoprasum* L. *Vortr. Pflanzenzüchtg.* 32: 163-165.

- ENGELKE, T. UND T. TATLIOGLU, 1996b Molecular characterization of the genic male sterility in comparison with the cytoplasmic male sterility in *Allium schoenoprasum* L. Proceedings of the International Symposium on Breeding Research on Medicinal And Aromatic Plants, Quedlinburg, Germany, June 30-July 4, 1996). Beiträge zur Züchtungsforschung 2: 206-209
- ERICKSON, L. UND R. KEMBLE, 1993: The effect of genotype on pollen transmission of mitochondria in rapeseed (*Brassica napus*). Sex. Plant Reprod. 6: 33-39.
- ERICKSON, L. UND R. KEMBLE, 1990: Paternal inheritance of mitochondria in rapeseed (*Brassica napus*). Mol. Gen. Genet. 222: 135-139.
- ERICKSON, L., R. KEMBLE UND E. SWANSON, 1989: The *Brassica* mitochondrial plasmid can be sexually transmitted. Pollen transfer of a cytoplasmic genetic element. Mol. Gen. Genet. 218: 419-422.
- ESCOTE, L.J., S. GABAY-LAUGHNAN UND J.R. LAUGHNAN, 1985: Cytoplasmic reversion to fertility in cms-S maize need not involve loss of linear mitochondrial plasmids. Plasmid 14: 264-267.
- ESCOTE-CARLSON, L.J., S. GABAY-LAUGHNAN UND J.R. LAUGHNAN, 1990: Nuclear genotype affects mitochondrial genome organization of CMS-S maize. Mol. Gen. Genet. 223: 457-464.
- ESCOTE-CARLSON, L.J., S. GABAY-LAUGHNAN UND J.R. LAUGHNAN, 1988: Reorganization of mitochondrial genomes of cytoplasmic revertants in cms-S inbred line WF9 in maize. Theor. Appl. Genet. 75: 659-667.
- ETOH, T., 1996: Cytogenetics in garlic. Proceedings of the International Symposium on Breeding Research on Medicinal And Aromatic Plants, Quedlinburg, Germany, June 30-July 4, 1996. Beiträge zur Züchtungsforschung 2: 108-115
- FALK, D.E. UND K.J. KASHA, 1982: Registration of a shrunken endosperm male sterile germ plasm to facilitate hybridization in barley (Reg. No. GP 59). Crop Sci. 22: 450.
- FAN, Z.G. UND B.R. STEFANSSON, 1986: Influence of temperature on sterility of two cytoplasmic male-sterility systems in rape (*Brassica napus* L.). Can. J. Plant Sci. 66: 221-227.
- FAURÉ, S., J.L. NOYER, F. CARREEL, J.P. HORRY, F. BAKRY UND C. LANAUD, 1994: Maternal inheritance of chloroplast genome and paternal inheritance of mitochondrial genome in bananas (*Musa acuminata*). Curr. Genet. 25: 265-269.
- FAURON, C.M.-R. UND M. CASPAR, 1994: Second type of normal maize mitochondrial genome: An evolutionary link. Genetics 137: 875-882.
- FAURON, C.M.-R., M. CASPAR, R.F. GESTELAND UND M. ALBERTSEN, 1992: A multi-recombination model for the mtDNA rearrangements seen in maize cmsT regenerated plants. Plant Journal 2: 949-958.
- FAURON, C.M.-R., M. HAVLIK, S. HAFEZI, R.I.S. BRETTELL UND M. ALBERTSEN, 1990: Study of two different recombination events in maize cmsT regenerated plants during reversion to fertility. Theor. Appl. Genet. 79: 593-599.
- FEYS, B.J.F., C.E. BENEDETTI, C.N. PENFOLD UND J.G. TURNER, 1994: *Arabidopsis* mutants selected for resistance to the phytotoxin coronatine are male sterile, insensitive to methyl jasmonate, and resistant to a bacterial pathogen. Plant Cell 6: 751-759.

- FLAMAND, M.C., G. DUC, J.P. GOBLET, L. HONG, O. LOUIS, M. BRIQUET UND M. BOUTRY, 1993: Variant mitochondrial plasmids of broad bean arose by recombination and are controlled by the nuclear genome. *Nucleic Acids Res.* 21: 5468-5473.
- FLAVELL, R., 1974: A model for the mechanism of cytoplasmic male sterility in plants, with special reference to maize. *Plant Sci. Let.* 3: 259-263.
- FOLKERTS, O. UND M.R. HANSON, 1991: The male sterility-associated *pcf* gene and the normal *atp9-1* gene in *Petunia* are located on different mitochondrial DNA molecules. *Genetics* 129: 885-895.
- FORDE, B.G. UND C.J. LEAVER, 1980: Nuclear and cytoplasmic genes controlling synthesis of variant mitochondrial polypeptides in male-sterile maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 418-422.
- FORDE, B.G., R.J.C. OLIVER UND C.J. LEAVER, 1978: Variation in mitochondrial translation products associated with male-sterile cytoplasm in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 3841-3845.
- FORSTHOEFEL, N.R., H.J. BOHNERT UND S.E. SMITH, 1992: Discordant inheritance of mitochondrial and plastid DNA in diverse alfalfa genotypes. *J. Hered.* 83: 342-345.
- FRANKEN, A.A. 1970: Sex characteristics and inheritance of sex in asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *Euphytica* 19: 277-287.
- GALINAT, W.C., 1983: The efficiency of the Megasort 6 machine from Geosource in separating white and yellow kernels within inbreds MA 400 and IL 677a. *Maize Genet. Coop. Newslet.* 57: 150-151.
- GALINAT, W.C., 1976: Genetic systems for the production of hybrid corn seed without detasseling. *Maize Genet. Coop. Newslet.* 50: 72.
- GALLI, M.G., M. BRACALE, A. FALAVIGNA, F. RAFFALDI, C. SAVINI UND A. VIGO 1993: Different kinds of male flowers in the dioecious plant *Asparagus officinalis* L.. *Sex. Plant Reprod.* 6: 16-21.
- GALUN, E., 1961: Study of the inheritance of sex expression in the cucumber: the interaction of major genes with modifying genetic and non-genetic factors. *Genetica* 32: 134-163.
- GOLDBERG, R.B., T.P. BEALS UND P.M. SANDERS, 1993: Anther development: Basic principles and practical applications. *Plant Cell* 5: 1217-1229.
- GORMAN, S.W. UND S. MCCORMICK, 1997: Male sterility in tomato. *Crit. Rev. Plant Sci.* 16: 31-53.
- GUO, F.L. UND S.Y. HU, 1995: Cytological evidence of biparental inheritance of plastids and mitochondria in *Pelargonium*. *Protoplasma* 186: 201-207.
- GUTIERRES, S., M. SABAR, C. LELANDAIS, P. CHETRIT, P. DIOLEZ, H. DEGAND, M. BOUTRY, F. VEDEL, Y. DE KOUCHOSKY UND R. DE PAEPE, 1997: Lack of mitochondrial and nuclear-encoded subunits of complex I and alteration of the respiratory chain in *Nicotiana sylvestris* mitochondrial deletion mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 3436-3441.
- HACK, E. UND C.J. LEAVER, 1984: Synthesis of a dicyclohexylcarbodiimide-binding proteolipid by cucumber (*Cucumis sativus* L.) mitochondria. *Curr. Genet.* 8: 537-542.

- HACK, E., C. LIN, H. YANG UND H.T. HORNER, 1991: T-URF13 protein from mitochondria of Texas male-sterile maize (*Zea mays* L.). *Plant Physiol.* 95: 861-870.
- HAGEMANN, R. UND M.B. SCHRÖDER, 1989: The cytological basis of the plastid inheritance in angiosperms. *Protoplasma* 152: 57-64.
- HÅKANSSON, G. UND C. GLIMELIUS, 1991: Extensive nuclear influence on mitochondrial transcription and genome structure in male-fertile and male-sterile alloplasmic *Nicotiana* materials. *Mol. Gen. Genet.* 229: 380-388.
- HÅKANSSON, G., C. GLIMELIUS UND H.T. BONNET, 1990: Respiration in cells and mitochondria of male-fertile and male-sterile *Nicotiana* sp. *Plant Physiol.* 93: 367-373.
- HÅKANSSON, G., F. VAN DER MARK, H.T. BONNET UND K. GLIMELIUS, 1988: Variant mitochondrial protein and DNA patterns associated with cytoplasmic male-sterile lines of *Nicotiana*. *Theor. Appl. Genet.* 76: 431-437.
- HANDA, H., J.M. GUALBERTO UND J.M. GRIENENBERGER, 1995: Characterization of the mitochondrial *orfB* gene and its derivative, *orf224*, a chimeric open reading frame specific to one mitochondrial genome of the "Polima" male-sterile cytoplasm in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Curr. Genet.* 28: 546-552.
- HANSON, M.R. UND O. FOLKERTS, 1992: Structure and function of the higher plant mitochondrial genome. *Int. Rev. Cytol.* 141: 129-172.
- HAVEY, M.J., 1997: Predominant paternal transmission of the mitochondrial genome in *Cucumber*. *J. Hered.* 88: 232-235.
- HAVEY, M.J., 1993: A putative donor of S-cytoplasm and its distribution among open-pollinated populations of onion. *Theor. Appl. Genet.* 86: 128-134.
- HAVEY, M.J., J.D. MCCREIGHT, B. RHODES UND G. TAURICK, 1998: Differential transmission of the *Cucumis* organellar genomes. *Theor. Appl. Genet.* 97: 122-128.
- HE, S., A. LYZNIK UND S. MACKENZIE, 1995: Pollen fertility restoration by nuclear gene *Fr* in CMS bean: nuclear directed alteration of a mitochondrial population. *Genetics* 139: 955-962.
- HE, S., A.R. ABAD, S.B. GELIN UND S.A. MACKENZIE, 1996: A cytoplasmic male sterility-associated mitochondrial protein causes pollen disruption in transgenic tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 11763-11768.
- HEMBLEBEN, V. 1990: *Molekularbiologie der Pflanzen*. Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart.
- HICKS, G.S., J. BELL, AND S.A. SAND, 1977: A developmental study of the stamens in a male-sterile tobacco hybrid. *Can. J. Bot.* 55: 2234-2244.
- HOLFORD, P., J.H. CROFT UND H.J. NEWBURY, 1991a: Structural studies of microsporogenesis in fertile and male-sterile onions (*Allium cepa* L.) containing the cms-S cytoplasm. *Theor. Appl. Genet.* 82: 745-755.
- HOLFORD, P., J.H. CROFT UND H.J. NEWBURY, 1991b: Differences between, and possible origins of, the cytoplasm found in fertile and male-sterile onions (*Allium cepa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 82: 737-744.
- HORN, R. UND W. FRIEDT, 1997: Fertility restoration of new CMS sources in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Breeding* 116: 317-322.
- HORN, R., R.H. KÖHLER UND K. ZETSCHKE, 1991: A mitochondrial 16kDa protein is associated with cytoplasmic male sterility in sunflower. *Plant Mol. Biol.* 17: 29-36.

- HORN, R., J.E.G. HUSTEDT, A. HORSTMAYER, J. HAHNEN, K. ZETSCHKE UND W. FRIEDT, 1996: The CMS-associated 16 kDa protein encoded by orfH522 in the PET1 cytoplasm is also present in other male-sterile cytoplasm of sunflower. *Plant Mol. Biol.* 30: 523-538.
- HORNER, H.T. UND R.G. PALMER, 1995: Mechanisms of genic male sterility. *Crop. Sci.* 35: 1527-1535.
- HUANG, J., S.H. LEE, C. LIN., R. MEDICI, E. HACK UND A.M. MEYERS, 1990: Expression in yeast of the T-URF13 protein from Texas male sterile maize mitochondria confers sensitivity to methomyl and to Texas-cytoplasm-specific fungal toxins. *EMBO J.* 9: 339-347.
- HUI, F., Y. WIE UND S. ZHANG, 1995: Inheritance of and utilization model for genic male sterility in cabbage (*Brassica pekinensis* Rupr.). *Acta Hort.* 402: 133-140.
- HUIJSER, P., J. KLEIN, W.E. LÖNNIG, H. MEIJER, H. SAEDLER UND H. SOMMER, 1992: Brateomania, an inflorescence anomaly, is caused by the loss of function of the MADS-box gene *Squamosa* in *Antirrhinum*. *EMBO J.* 11: 1239-1249.
- IWABUCHI, M., J. KYOZUKA UND K. SHIMAMOTO, 1993: Processing followed by editing of altered mitochondrial *atp6* RNA restores fertility of cytoplasmic male sterility rice. *EMBO J.* 12: 1437-1446.
- JAISWAL, P., A.P. SANE, S.A. RANADE, P. NATH UND P.V. SANE, 1998: Mitochondrial and total DNA RAPD patterns can distinguish restorers of CMS lines in Sorghum. *Theor. Appl. Genet.* 96: 791-796.
- JANSKA, H. UND S.A. MACKENZIE, 1993: Unusual mitochondrial genome organization in cytoplasmic male sterile common bean and the nature of cytoplasmic reversion to fertility. *Genetics* 135: 869-879.
- JANSKA, H., R. SARRIA, M. WOLOSZYNSKA, M. ARRIETA-MONTIEL UND S.A. MACKENZIE, 1998: Stoichiometric shifts in the common bean mitochondrial genome leading to male sterility and spontaneous reversion to fertility. *Plant Cell* 10: 1163-1180.
- JENSEN, W.A. UND D.B. FISHER, 1968: Cotton embryogenesis: The entrance and discharge of the pollen tube in the embryo sac. *Planta* 78: 158-183.
- JIA, M.H., S. HE, W. VANHOUTEN UND S. MACKENZIE, 1997: Nuclear fertility restorer genes map to the same linkage group in cytoplasmic male-sterile bean. *Theor. Appl. Genet.* 95: 205-210.
- JOHNS, C., L. MEIQUING, A. LYZNIK UND S. MACKENZIE, 1992: A mitochondrial DNA sequence is associated with abnormal pollen development in cytoplasmic male sterile bean plants. *Plant Cell* 4: 435-449.
- JONES, H.A. UND A.E. CLARKE, 1943: Inheritance of male sterility in the onion and the production of hybrid seed. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 43: 189-194.
- JOYCE, P.B.M. UND M.W. GRAY, 1989: Chloroplast-like transfer RNA genes expressed in wheat mitochondria. *Nucleic Acids Res.* 17: 5461-5476.
- KADOWAKI K., T. SUZUKI UND S. KAZAMA, 1990: A chimeric gene containing the 5' portion of *atp6* is associated with cytoplasmic male-sterility of rice. *Mol. Gen. Genet.* 224: 10-16.
- KAMPS, T.L., MCKARTY, D.R. UND C. D. CHASE, 1996: Gametophyte genetics in *Zea mays* L.: Dominance of a restoration-of-fertility allele (*Rf3*) in diploid pollen. *Genetics* 142: 1001-1007.

- KAUL, M.H.L., 1988: Male sterility in higher plants. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.
- KENNEL, J.C. UND D.R. PRING, 1989: Initiation and processing of *atp6*, *T-urf13* and *orf221* transcripts from mitochondria of T cytoplasm maize. *Mol. Gen. Genet.* 216: 16-24.
- KHEHRA, A.S. UND S.K. BHALLA, 1976: Cytoplasmic effects on quantitative characters in maize (*Zea mays* L.). *Theor. Appl. Genet.* 47: 271-274.
- KHRISHNASAMY, S. UND C.A. MAKAROFF, 1994: Organ-specific reduction in the abundance of a mitochondrial protein accompanies fertility restoration in cytoplasmic male-sterile radish. *Plant Mol. Biol.* 26: 935-946.
- KIANG, A.S. UND T.A. KAVANAGH, 1996: Cytoplasmic male sterility (CMS) in *Lolium perenne* L. 2. The mitochondrial genome of a CMS line is rearranged and contains a chimaeric *atp9* gene. *Theor. Appl. Genet.* 92: 308-315.
- KIANG, A.S., V. CONNOLLY, D.J. MCCONNELL UND T.A. KAVANAGH, 1994: Paternal inheritance of mitochondria and chloroplasts in *Festuca pratensis* – *Lolium perenne* intergeneric hybrids. *Theor. Appl. Genet.* 87: 681-688.
- KINMAN, M.L., 1970: New development in the USDA and State Experiment Station sunflower breeding programs. Proc. 4th Int. Sunflower Conf., Memphis USA, 23-25 Jun, 1970, 181-183. Int. Sunflower Assoc., Toowoomba.
- KOFER, W., K. GLIMELIUS UND H.T. BONNETT, 1992: Fusion of male-sterile tobacco causes modifications of mtDNA leading to changes in floral morphology and restoration of fertility in hybrid plants. *Plant Physiol.* 85: 334-338.
- KOFER, W., K. GLIMELIUS UND H.T. BONNETT, 1991: Modifications of mitochondrial DNA cause changes in floral development in homeotic-like mutants of tobacco. *Plant Cell* 3: 759-769.
- KÖHLER, R.H., R. HORN, A. LÖSSL UND K. ZETSCHKE, 1991: Cytoplasmic male sterility in sunflower is correlated with the co-transcription of a new open reading frame with the *atpA* gene. *Mol. Gen. Genet.* 227: 369-376.
- KONVICKA, O., F. NIENHAUS, UND G. FISCHBECK, 1978: Untersuchungen über die Ursachen der Pollensterilität bei *Allium sativum* L. *Z. Pflanzenzüchtg.* 80: 265-276.
- KRISHNASAMY, S. UND C.A. MAKAROFF, 1994: Organ-specific reduction in the abundance of a mitochondrial protein accompanies fertility restoration in cytoplasmic male-sterile radish. *Plant Mol. Biol.* 26: 935-946.
- KRISHNASAMY, S. UND C.A. MAKAROFF, 1993: Characterisation of the radish mitochondrial *orfB* locus: possible relationship with male sterility in *Ogura* radish. *Curr. Genet.* 24: 156-163.
- KRUG, H. UND E. FÖLSTER, 1976: Influence of the environment on growth and development of chives (*Allium schoenoprasum* L.). I. Induction of the rest period. *Scientia Horticulturae* 4: 211-220.
- KUCKUCK, H. 1979: Gartenbauliche Pflanzenzüchtung, 2. Auflage, Verlag Paul Parey, Berlin.
- LAEMMLI, U.K., 1970: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- LANDGREN, M. UND K. GLIMELIUS, 1994: A high frequency of intergenomic mitochondrial recombination and an overall biased segregation of *B. campestris* or recombined *B.*

- campestris* mitochondria were found in somatic hybrids made within Brassicaceae. *Theor. Appl. Genet.* 87: 854-862.
- LANDGREN, M., M. ZETTERSTRAND, E. SUNDBERG UND K. GLIMELIUS, 1996: Alloplasmic male-sterile *Brassica* lines containing *B. tournefortii* mitochondria express an ORF 3' of the *atp6* gene and a 32 kDa protein. *Plant Mol. Biol.* 32: 879-890.
- LANG, B.F., G. BURGER, C.J. O'KELLY R. CEDERGREN, G.B. GOLDING, C. LEMIEUX, D. SANKOFF, M. TURMEL UND M.W. GRAY, 1997: An ancestral mitochondrial DNA resembling an eubacterial genome in miniature. *Nature* 387: 493-496.
- LAUGHNAN, J.R. UND S.J. GABAY-LAUGHNAN, 1983: Cytoplasmic male sterility in maize. *Ann. Rev. Genet.* 17: 27-48.
- LAVER, H.K., S.J. REYNOLDS, F. MONEGER UND C.J. LEAVER, 1991: Mitochondrial genome organization and expression associated with cytoplasmic male sterility in sunflower (*Helianthus annuus*). *Plant Journal* 1: 185-193.
- LAW, R.H.P., S. MANON, R. DEVENISH UND P. NAGLEY, 1995: ATP Synthase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Meth. Enzymol.* 260: 133-163.
- LAZARTE, J.E. UND B.F. PALSER, 1979: Morphology, vascular anatomy and embryology of pistillate and staminate flowers of *Asparagus officinalis* L.. *J. Am. Hort. Sci.* 66: 753-764.
- LEAVER, C.J. UND M.W. GRAY, 1982: Mitochondrial genome organization and expression in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 33: 373-402.
- LEAVER, C.P., E. HACK UND B.G. FORDE, 1983: Protein Synthesis by isolated plant mitochondria. *Meth. Enzymol.* 97: 467-484.
- LEBACQ, P. UND F. VEDEL, 1981: *SalI* restriction enzyme analysis of chloroplast and mitochondrial DNAs in the genus *Brassica*. *Plant Sci. Lett.* 23: 1-9.
- LECLERCQ, P., 1969: Une stérilité cytoplasmique chez le tournesol. *Ann. Amélior. Plant.* 19: 99-106.
- LELANDAIS, C., B. ALBERT, S. GUTIERRES, R. DE PAEPE, B. GODELLE, F. VEDEL UND P. CHÉTRIT, 1998: Organisation and expression of the mitochondrial genome in the *Nicotiana sylvestris* GMSII mutant. *Genetics* 150: 873-882.
- LEVINGS III, C.S., 1996: Infertility Treatment: A Nuclear Restorer Gene in Maize. *Science* 272: 1279-1280.
- LEVINGS III, C.S., 1993: Thoughts on cytoplasmic male sterility in cms-T maize. *Plant Cell* 5: 1285-1290.
- LEVINGS III, C.S. UND J.N. SIEDOW 1992: Molecular basis of disease susceptibility in the Texas cytoplasm of maize. *Plant Mol. Biol.* 19:135-147.
- LEVINGS III, C.S. UND R.R. SEDEROFF, 1983: Nucleotide sequence of the S-2 mitochondrial DNA from the S cytoplasm of maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 4055-4059.
- LEVY, A.A., C.P. ANDRÉ UND V. WALBOT, 1991: Analysis of a 120 kilobase mitochondrial chromosome in maize. *Genetics* 128: 417-424.
- LEWERS, K.S., S.K. ST. MARTIN, B.R. HEDGES, M.P. WIDRLECHNER UND R.G. PALMER, 1996: Hybrid soybean seed production: comparison of three methods. *Crop Sci.* 36: 1560-1567.

- L'HOMME Y., R.J. STAHL, X.Q. LI, A. HAMEED UND G.G. BROWN, 1997: *Brassica nap* cytoplasmic male sterility is associated with expression of a mtDNA region containing a chimeric gene similar to the pol CMS-associated *orf224* gene. *Curr. Genet.* 31: 325-335.
- LI, X.Q., M. JEAN, B.S. LANDRY UND G.G. BROWN, 1998: Restorer genes for different forms of *Brassica* cytoplasmic male sterility map to a single nuclear locus that modifies transcripts of several mitochondrial genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 10032-10037.
- LI, X.Q., P. CHÉTRIT, C. MATHIEU, F. VEDEL, R. DE PAEPE, R. REMY UND F. AMBARD-BRETTEVILLE, 1988: Regeneration of cytoplasmic male sterile protoclones of *Nicotiana sylvestris* with mitochondrial variations. *Curr. Genet.* 13: 261-266.
- LIANG, P. UND A.B. PARDEE, 1992: Differential display of eucariotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*: 257: 967-971.
- LIANG, P., L. AVERBOUKH UND A.B. PARDEE, 1993: Distribution and cloning of eucariotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization. *Nucleic Acids Res.* 21: 3269-3275.
- LIND, C., C. HALLDEN UND I. MOLLER, 1991: Protein synthesis in mitochondria purified from roots, leaves and flowers of sugar beet. *Physiol. Plant.* 83: 7-16.
- LIPPOK, P., A. BRENNICKE UND B. WISSINGER, 1994: Differential RNA editing in closely related introns in *Oenothera* mitochondria. *Mol. Gen. Genet.* 243: 39-46.
- LITTLE, T., H. JONES UND A. CLARKE, 1944: The distribution of the male-sterility gene in varieties of onion. *Herbertia* 11: 310-312.
- LOHMANN, J., H.P. SCHIKLE UND T.C.G. BOSCH, 1995: REN Display, a rapid and efficient method for nonradioactive differential display and mRNA isolation. *Bio.Tech.* 18: 200-202.
- LONSDALE, D.M., 1984: A review of the structure and organization of the mitochondrial genome of higher plants. *Plant Mol. Biol.* 3: 201-206.
- LÖPTIEN, H. 1979: Identification of sex chromosome pair in asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *Z. Pflanz.* 82: 162-173.
- LORENZ, M., A. WEIHE UND T. BÖRNER, 1994: DNA fragments of organellar origin in random amplified polymorphic DNA (RAPD) patterns of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Theor. Appl. Genet.* 88: 775-779.
- LOVE, S.L., B.B. RHODES UND E. NUGENT, 1986: Controlled pollination transfer of a nuclear male-sterile gene from a diploid to a tetraploid watermelon line. *Euphytica* 35: 633-638.
- MA, H., M.F. YANOFSKY UND E.M. MEYEROWITZ, 1991: *AGLI-AGL6*, an *Arabidopsis* gene family with similarity to floral homeotic and transcription factor genes. *Genes Dev.* 5: 484-495.
- MACHON, N., V. DELETRELEBOULCH UND C. RAMEAU 1995: Quantitative analysis of sexual dimorphism in *Asparagus*. *Can. J. Bot.* 73: 1780-1786.
- MACKENZIE, S.A. UND C.D. CHASE, 1990: Fertility restoration is associated with loss of a portion of the mitochondrial genome in cytoplasmic male-sterile common bean. *Plant Cell* 2: 905-912.

- MACKENZIE, S.A. UND M.J. BASSETT, 1987: Genetics of fertility restoration in cytoplasmic male sterile *Phaseolus vulgaris* L. I. Cytoplasmic alteration by a nuclear restorer gene. *Theor. Appl. Genet.* 74: 642-645.
- MACKENZIE, S., S. HE UND A. LYZNIK, 1994: The elusive plant mitochondrion as a genetic system. *Plant. Physiol.* 105: 775-780.
- MANDEL, M.A., C. GUSTAFSON-BROWN, B. SAVIDGE UND M.F. YANOFSKY 1992: Molecular characterization of *Arabidopsis* floral homeotic gene *APETELA1*. *Nature* 360: 273-277.
- MANNSCHEDEL, A. 1989: Molekularbiologische Charakterisierung der cytoplasmatischen männlichen Sterilität von Schnittlauch (*Allium schoenoprasum* L.). Dissertation am Fachbereich Biologie der Universität Hannover.
- MANS, R.J. UND D. NOVELLI, 1961: Measurement of the incorporation of radioactive amino-acids into protein by a filter-paper disk method. *Arch. Biochem. Biophys.* 94: 48-53.
- MARIANI C., M. DE BEUCKELEER, J. TRUETTNER, J. LEEMANS UND R.B. GOLDBERG, 1990: Induction of male sterility in plants by a chimaeric ribonuclease gene. *Nature* 347: 737-741.
- MARIANI, C., V. GOSSELE, M. DE BEUCKELEER, M. DE BLOCK, R.B. GOLDBERG, W. DE GREEF UND J. LEEMANS, 1992: A chimaeric ribonuclease-inhibitor gene restores fertility to male sterile plants. *Nature* 357: 384-387.
- MARKAROFF, C.A. UND J.D. PALMER, 1988: Mitochondrial DNA rearrangements and transcriptional alterations in the male sterile cytoplasm of Ogura radish. *Mol. Cell. Biol.* 8: 1474-1480.
- MARKS, M. 1973: A reconsideration of the genetic mechanism for sex determination in *Asparagus officinalis*. Proceedings of the Eucarpia Meeting on Asparagus, Versailles: 122-128.
- MARTINEZ-ZAPATER, J.M., P. GIL, J. CAPEL UND C.R. SOMERVILLE, 1992: Mutations at the *Arabidopsis* CHM locus promote rearrangements of the mitochondrial genome. *Plant Cell* 4: 889-899.
- MASON R.J., K.E. HOLSINGER UND R.K. JANSEN, 1994: Biparental Inheritance of the Chloroplast Genome in *Coreopsis* (Asteraceae). *J. Hered.* 85: 171-173.
- MASOUD, S.A., L.B. JOHNSON UND E.L. SORENSEN, 1990: High transmission of paternal plastid DNA in alfalfa plants demonstrated by restriction fragment polymorphic analysis. *Theor. Appl. Genet.* 79: 49-55.
- MATSUURA, S., 1995: Paternal Inheritance of Mitochondrial DNA in Cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Cucurbit Genet. Coop. Rep.* 18: 31-33.
- MATSUURA, S. UND H. MIZUSAWA, 1998: Paternal Inheritance of Mitochondrial DNA in Cucumber: Confirmation by PCR Method. *Cucurbit Genet. Coop. Rep.* 21: 6-7.
- MEDGYESY, P., A. PAY UND L. MARTON, 1986: Transmission of paternal chloroplasts in *Nicotiana*. *Mol. Gen. Genet.* 204: 195-198.
- MEER, Q.P. VAN DER, UND J.L. VAN BENNEKOM, 1969: Effect of temperature on the occurrence of male sterility in onion (*Allium cepa* L.). *Euphytica* 18: 389-394.
- MELCHERS, G., Y. MOHRI, K. WATANABE, S. WAKABAYASHI, UND K. HARADA 1992: One-step generation of cytoplasmic male sterility by fusion of mitochondrial-inactivated

- Tomato protoplasts with nuclear-inactivated *Solanum* protoplasts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 6832-6836.
- MENCZEL, L., A. MORGAN, S. BROWN UND P. MALIGA, 1987: Fusion-mediated combination of Ogura-type cytoplasmic male sterility with *Brassica napus* plastids using X-irradiated CMS protoplasts. Plant Cell. Rep. 6: 98-101.
- MESHARAM, L.D. UND M.N. NARKHEDE, 1982: Natural male sterile mutant in hot chilli (*Capsicum annuum* L.). Euphytica 31: 1003-1005.
- MILLER, R.L., R.M. SHIBLES, E.G. HAMMOND UND D.E. GREEN, 1996: Effect of unique cytoplasms in reciprocal crosses of soybean. Crop Sci. 36: 1196-1206.
- MIYAMURA, S., T. KUROIWA UND T. NAGATA, 1987: Disappearance of plastid and mitochondrial nucleoids during the formation of generative cells of higher plants revealed by fluorescence microscopy. Protoplasma 141: 149-159.
- MOFFATT, B. UND C. SOMERVILLE, 1988: Positive Selection for Male-Sterile Mutants of *Arabidopsis* Lacking Adenine Phosphoribosyl Transferase Activity. Plant Physiol. 86: 1150-1154.
- MOGENSEN, H.L., 1996: The hows and whys of cytoplasmic inheritance in seed plants. Am. J. Bot. 83: 383-404.
- MOGENSEN, H.L., 1988: Exclusion of male mitochondria and plastids during syngamy in barley as a basis for maternal inheritance. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2594-2597.
- MOGENSEN, H.L. UND M.L. RUSCHE, 1985: Quantitative analysis of barley sperm: occurrence and mechanism of cytoplasm and organelle reduction and the question of sperm dimorphism. Protoplasma 128: 1-13.
- MONÉGER, F., C.J. SMART UND C.J. LEAVER, 1994: Nuclear restoration of cytoplasmic male sterility in sunflower is associated with the tissue-specific regulation of a novel mitochondrial gene. EMBO J. 13: 8-17.
- MOSJIDIS, J.A. UND D.M. YERMANOS, 1984: Maternal effects and cytoplasmic inheritance of oleic and linoleic acid contents in sesame. Euphytica 33: 427-432.
- MUNJAL S., B.B. DESAI, S.Y. DAFTARDAR, D.R. BAPAT UND M.S. NAIK, 1988: Carbon monoxide sensitivity of cytochrome c oxidase in male sterile seedlings of sorghum. Phytochemistry. 27: 3367-3371.
- MURAI, K., 1997: Effects of *Aegilops crassa* cytoplasm on the agronomic characters in photoperiod-sensitive CMS wheat lines and F-1 hybrids. Breeding Science 47: 321-326.
- MURASHIGE, T. UND F. SKOOG, 1962: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Phsiol. Plant 15: 473-497.
- MUSGRAVE, M.E., J. ANTONOICS UND J.N. SIEDOW, 1986: Is male-sterility in plants related to lack of cyanide resistant respiration in tissues? Plant Sci. 44: 7-11.
- NAKAJIMA, Y., T. YAMAMOTO UND K. OEDA, 1997: Genetic variation of mitochondrial and nuclear genomes in carrots revealed by random amplified polymorphic DNA (RAPD). Euphytica 95: 259-267.
- NAKAMURA, S., K. OGAWA UND T. KUROIWA, 1987: Survey of Ca²⁺ dependent nuclease in green plants. Plant Cell Physiol. 28: 545-548.

- NAKAMURA, S., T. IKEHARA, H. UCHIDA, T. SUZUKI UND SODMERGEN, 1992: Fluorescence microscopy of plastid nucleotids and a survey of nuclease C in higher plants with respect to mode of plastid inheritance. *Protoplasma* 169: 68-74.
- NARAYANAN, K., C. ANDRÉ, J. YANG UND V. WALBOT, 1993: Organization of a 117kB circular mitochondrial chromosome in IR36 rice. *Curr. Genet.* 23: 248-254.
- NEWTON, K.J. UND V. WALBOT, 1985: Maize mitochondria synthesize organ-specific polypeptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 6879-6883.
- NIVISON, H.T. UND M.R. HANSON, 1989: Identification of a mitochondrial protein associated with cytoplasmic male sterility in *Petunia*. *Plant Cell* 1: 1121-1130.
- NUGENT, J.M. UND J.D. PALMER, 1991: RNA-mediated transfer of the gene *coxII* from the mitochondrion to the nucleus during flowering plant evolution. *Cell* 66: 473-481.
- O'BRIAN, T.P. UND M.E. MCMULLY, 1981: The study of plant structure: principles and selected methods. *Termarcarphi*, Melbourne 1981.
- OGAWA, K. UND T. KUROIWA, 1985: Nuclease C: polymorphism of calcium-dependent nucleases in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Physiol.* 26: 481-491.
- OGURA, H., 1968: Studies on the new male sterility in Japanese radish, with special references on the utilization of this sterility towards the practical raising of hybrid seeds. *Meng. Fac. Agric. Kagoshima Univ.* 6: 39-78.
- ORGEL, L.E., F.H.C. CRICK UND C. SAPIENZA, 1980: Selfish DNA. *Nature* 288: 645-646.
- DE PAEPE, R., A. FORCHIONI, P. CHETRIT UND F. VEDEL, 1993: Specific mitochondrial proteins in pollen: Presence of an additional ATP synthase β subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5934-5938.
- DE PAEPE, R., P. CHETRIT, V. VITART, F. AMBARD-BRETTEVILLE, D. PRAT UND F. VEDEL, 1990: Several nuclear genes control both male sterility and mitochondrial protein synthesis in *Nicotiana sylvestris* protoclones. *Mol. Gen. Genet.* 222: 206-219.
- PAILLARD, M., R.R. SEDEROFF UND C.S. LEVINGS III, 1985: Nucleotide sequence of the S-1 mitochondrial DNA from the S cytoplasm of maize. *EMBO J.* 4: 1125-1128.
- PALMER, J.D. UND L.A. HERBORN, 1987: Unicircular structure of the *Brassica hirta* mitochondrial genome. *Curr. Genet.* 11: 565-570.
- PALMER, J.D. UND C.R. SHIELDS, 1984: Tripartite structure of the *Brassica campestris* mitochondrial genome. *Nature* 307: 437-440.
- PARKER, J.S. 1990: Sex chromosomes and sexual differentiation in flowering plants. *Chromosomes Today* 10: 187-198.
- PARKER, J.S. UND M.S. CLARK, 1991: Dosage sex-chromosome systems in plants. *Plant Sci.* 80: 79-92.
- PEARSON, D.H., 1981: Nature and mechanisms of cytoplasmic male sterility in plants. *Hort. Sci.* 16: 482-487.
- PELLETIER, G., C. PRIMARD, F. VEDEL, P. CHÉTRIT UND R. REMY, 1983: Intergeneric cytoplasmic hybridization in Cruciferae by protoplast fusion. *Mol. Gen. Genet.* 191: 224-250.
- PERL, M., D. SWARTZBERG UND S. IZHAR, 1993: Phosphatase and ATPase activities in isonuclear lines of cytoplasmic male-sterile and male-fertile *Petunia*. *Theor. Appl. Genet.* 86: 49-53.

- PERL, M., D. SWARTZBERG UND S. IZHAR, 1992: Differences in amino acid transport in isonuclear lines of cytoplasmic male-sterile and male-fertile petunia. *Theor. Appl. Genet.* 84: 92-96.
- PISKUR, J., 1989: Transmission of the yeast mitochondrial genome to progeny: The impact of intergenic sequences. *Mol. Gen. Genet.* 218: 161-168.
- PLA, M., C. MATHIEU, R. DE PAEPE, P. CHÉTRIT UND F. VEDEL, 1995: Deletion of the last two exons of the mitochondrial *nad7* gene results in lack of the NAD7 polypeptide in a *Nicotiana glauca* CMS mutant. *Mol. Gen. Genet.* 248: 79-88.
- POTZ, H., 1992: Interaktionen zwischen Chondriom und Kerngenom im CMS-System bei Schnittlauch (*Allium schoenoprasum* L.) und Variabilität des Chondrioms unterschiedlicher Provenienzen. Dissertation am Fachbereich Gartenbau, Universität Hannover.
- POTZ, H. UND T. TATLIOGLU, 1993: Molecular analysis of cytoplasmic male sterility in chives (*Allium schoenoprasum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 87: 439-445.
- PRING, D.R., C.S. LEVINGS III, W.W.L. HU UND D.H. TIMOTHY, 1977: Unique DNA associated with mitochondria in the "S"-type cytoplasm of male-sterile maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 2904-2908.
- PRING, D.R., W. CHEN, H.V. TANG, W. HOWAD UND F. KEMPEN, 1998: Interaction of mitochondrial RNA editing and nucleolytic processing in the restoration of male fertility in *Sorghum*. *Curr. Genet.* 33: 429-436.
- PRUITT, K.D. UND M.R. HANSON, 1989: Cytochrom oxidase subunit II sequences in *Petunia* mitochondria: two intron-containing genes and an intron-less pseudogene associated with cytoplasmic male sterility. *Curr. Genet.* 16: 281-291.
- RAO, A.P. UND A.A. FLEMMING, 1978: Cytoplasmic-genotypic effects in the GT 112 maize inbred with four cytoplasms. *Crop Sci.* 18: 935-937.
- RAO, M.K., K. UMA DEVI UND A. ARUNDHATI, 1990: Applications of genic male sterility in plant breeding. *Plant Breed.* 105: 1-25.
- RASMUSSEN, J. UND M.R. HANSON, 1989: A NADH dehydrogenase subunit gene is co-transcribed with the abnormal *Petunia* mitochondrial gene associated with cytoplasmic male sterility. *Mol. Gen. Genet.* 215: 332-336.
- RATHBURN, H.B. UND C. HEDGECOTH, 1991: A chimeric open reading frame in the 5' flanking region of *coxI* mitochondrial DNA from cytoplasmic male-sterile wheat. *Plant Mol. Biol.* 16: 909-912.
- RAUBER, M., 1989: Untersuchungen zur männlichen Sterilität und *in vitro*-Massenvermehrung bei *Allium schoenoprasum* L. und *Allium ampeloprasum* L. var. *porrum*. Dissertation am Fachbereich Gartenbau der Universität Hannover.
- RAUBER, M. UND J. GRUNEWALD, 1988: *In vitro* regeneration in *Allium* species. *Plant Cell Rep.* 7: 426-429.
- RAUBER, M., M. MANNSCHEDEL UND J. GRUNEWALD, 1993: A new male sterility in chive (*Allium schoenoprasum* L.). *Gartenbauwissenschaft* 58: 54-59.
- RENARD, M., R. DELOURME, P. VALLÉE UND J. PIERRE, 1998: Hybrid rapeseed breeding and production. *Acta Hort.* 459: 291-298.
- RHOADS, D.M., B. BRUNNER-NEUENSCHWANDER, C.S. LEVINGS III UND J.N. SIEDOW, 1998: Cross-linking and disulfide bond formation of introduced cysteine residues

- suggest a modified model for the tertiary structure of urf 13 in the pore-forming oligomers. Arch. Biochem. Biophys. 354: 158-164.
- ROEVER, W.E., 1948: A promising type of male sterility for use in hybrid seed production. Science 107: 506.
- ROSS, M.D., 1978: The evolution of gynodioecy and subdioecy. Evolution 32: 174-188.
- ROTHENBERG, M. UND M.R. HANSON, 1987: Recombination between parental mitochondrial DNA following protoplast fusion can occur in a region which normally does not undergo intragenomic recombination in parental plants. Curr. Genet. 12: 235-240.
- ROTTMANN, W.T., T. BREARS, T.P. HODGE UND D.M. LONSDALE, 1987: A mitochondrial gene is lost via homologous recombination during reversion of CMS T maize to fertility. EMBO J. 6: 1541-1546.
- RUGE, B., 1996: Genetisch-züchterische und molekularbiologische Untersuchungen zur männlichen Sterilität beim Spinat (*Spinacia oleracea* L.). Dissertation am Fachbereich Gartenbau der Universität Hannover.
- RUGE, B., H. POTZ UND T. TATLIOGLU, 1993: Influence of different cytoplasms and nuclear genes involved in the CMS-system of chives (*Allium schoenoprasum* L.) on microsporogenesis. Plant Breeding 110: 24-28.
- RUSSEL, S.D., 1987: Quantitative Cytology of the egg and central cell of *Plumbago zeylanica* and its impact on cytoplasmic inheritance patterns. Theor. Appl. Genet. 74: 693-699.
- SACHS, L., 1978: Angewandte Statistik, Statistische Methoden und ihre Anwendungen, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- SAGHAI-MAROOF, M.A., K.M. SOLIMANN, R.A. JORGENSEN UND R.W. ALLARD, 1984: Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 8014-8018.
- SAINI, H.S., 1997: Effects of water stress on male gametophyte development in plants. Sex. Plant Reprod. 10: 67-73.
- SAKAMOTO, W., H. KONDO, M. MURATA UND F. MOTOYOSHI, 1996: Altered mitochondrial gene expression in a maternal distorted leaf mutant of *Arabidopsis* induced by chloroplast mutator. Plant Cell 8: 1377-1390.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. UND T. MANIATIS, 1989: Molecular cloning: A laboratory manual. 2. edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- SANE, A.P., P. NATH UND P.V. SANE, 1997: Differences in kinetics of F-1-ATPases of cytoplasmic male sterile, maintainer and fertility restored lines of *Sorghum*. Plant Sci. 130: 19-25.
- SARRIA, R., A. LYZNIK, C.E. VALLEJOS UND S.A. MACKENZIE, 1998: A cytoplasmic male sterility-associated mitochondrial peptide in common bean is post-translationally regulated. Plant Cell 10: 1217-1228.
- SATO, Y., 1998: PCR amplification of CMS-specific mitochondrial nucleotide sequences to identify cytoplasmic genotypes of onion (*Allium cepa* L.). Theor. Appl. Genet. 96: 367-370.

- SAWHNEY, K., 1983: Temperature control of male sterility in a tomato mutant. *J. Hered.* 74: 51-54.
- SAWHNEY, K., 1974: Morphogenesis of the stamenless-2 mutant in tomato. III. Relative levels of gibberellins in the normal and mutant plants. *J. Experiment. Bot.* 25: 1004-1009.
- SAWHNEY, P. UND A. SHUKLA, 1994: Male sterility in flowering plants: are plant growth substances involved. *Am. J. Bot.* 81: 1640-1647.
- SAWHNEY, P. UND R.I. GREYSON, 1973: Morphogenesis of the stamenless-2 mutant in tomato. II. Modification of sex organs in the mutant and normal flowers. *Can. J. Bot.* 51: 2473-2479.
- SCHÄGGER, H., UND G. VON JAGO, 1991: Blue native electrophoresis for the isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* 199: 223-231.
- SCHÄGGER, H. UND G. VON JAGOW, 1987: Tricine-Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100kDa. *Anal. Biochem.* 166: 368-379.
- SCHARDL, C.L., D.M. LONSDALE, D.P. PRING UND K.R. ROSE, 1984: Linearization of maize mitochondrial chromosomes by recombination with linear episomes. *Nature* 310: 292-296.
- SCHNABLE, P.S. UND R.P. WISE, 1998: The molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration. *Trends in Plant Science* 3: 175-180.
- SCHNEIDER, R., UND T. TATLIOGLU, 1996a: Das Temperaturlagen T des Schnittlauchs (*Allium schoenoprasum* L.) reduziert die Menge des CMS-spezifischen mitochondrialen 18-kDa Proteins nur bei hohen Temperaturen. *Vortr. Pflanzenzüchtg.* 32: 163-165.
- SCHNEIDER, R. UND T. TATLIOGLU, 1996b: Molecular investigations on tetracycline and temperature sensitivity of cytoplasmic male sterility in *Allium schoenoprasum* L. Proceedings of the International Symposium on Breeding Research on Medicinal And Aromatic Plants, Quedlinburg, Germany, June 30-July 4, 1996. *Beiträge zur Züchtungsforschung* 2: 202-205
- SCHNEIDER, R., UND T. TATLIOGLU, 1994: Tetracyclinsensitivität der cytoplasmatischen männlichen Sterilität (CMS) und mitochondriale Proteinbiosynthese beim Schnittlauch (*Allium schoenoprasum* L.). *Vortr. Pflanzenzüchtg.* 28: 143-145.
- SCHUMANN, C.M. UND J.F. HANCOCK, 1989: Paternal inheritance of plastids in *Medicago sativa*. *Theor. Appl. Genet.* 78: 863-866.
- SCHUSTER, W. UND A. BRENNICKE, 1988: Interorganellar sequence transfer: plant mitochondrial DNA is nuclear, is plastid, is mitochondrial. *Plant Sci.* 54: 1-10.
- SCHUSTER, W. UND A. BRENNICKE, 1987: Plastid, nuclear and reverse transcriptase sequences in mitochondrial genome of *Oenothera*: Is genetic information transferred between organelles via RNA? *EMBO J.* 6: 2857-2863.
- SCHWARTZ, R.M. UND M. O. DAYHOFF, 1978: Origins of prokaryotes, eukaryotes, mitochondria, and chloroplast. *Science* 199: 395-403.
- SCHWARZ-SOMMER, Z.S., P. HUIJSER, W. NACKEN, H. SAEDELER UND H. SOMMER, 1990: Genetic control of flower development by homeotic genes in *Antirrhinum majus*. *Science* 250: 931-936.

- SCHWEISGUTH, B., 1973: Etude d'un nouveau type de stérilité mâle chez l'oignon, *Allium cepa* L. Ann. Amél. Plant. 23: 221-233.
- SERIEYS, H., 1996: FAO progress report of the working group 'Identification, study and utilization in breeding programs of new CMS sources'. Helia (Special Iss.) 19: 144-157.
- SHORE, P. UND A.D. SHARROCS 1995: The MADS box family of transcription factors. Eur. J. Biochem. 229: 1-13.
- SHUKLA, A. UND K. SAWHNEY, 1997: Cytokinin metabolism and cytokinin oxidase and adenine phosphoribosyltransferase activity in male sterile *Brassica napus* leaves. Phytochemistry 44: 377-381.
- SICULELLA, L. UND J.D. PALMER, 1988: Physical and gene organization of mitochondrial DNA in fertile and male-sterile sunflower. Nucleic Acids Res. 16: 3787-3799.
- SIGAVERA, M.A. UND E.D. EARLE, 1997: Direct transfer of a cold-tolerant Ogura male-sterile cytoplasm into cabbage (*Brassica oleracea* ssp. *capitata*) via protoplast fusion. Theor. Appl. Genet. 94: 213-220.
- SILLIKER, M.E., M.R. LIOTTA UND D.J. CUMMINGS, 1996: Elimination of mitochondrial mutations by sexual reproduction: two *Podospora anserina* mitochondrial mutants yield only wild-type progeny when mated. Curr. Genet. 30: 318-324.
- SINGH, M. UND G.G. BROWN, 1991: Suppression of cytoplasmic male sterility by nuclear genes alters expression of a novel mitochondrial gene region. Plant Cell 3: 1349-1362.
- SINGH, M., N. HAMEL, R. MENASSA, X.Q. LI; B. YOUNG, M. JEAN, B.S. LANDRY UND G.G. BROWN, 1996: Nuclear genes associated with a single *Brassica* CMS restorer locus influence transcripts of three different mitochondrial gene regions. Genetics 143: 505-516.
- SINGH, S., K. SAWHNEY UND D.W. PEARCE, 1992: Temperature effects on endogenous indole-3-acetic acid levels in leaves and stamens of the normal and male sterile 'stamenless-2' mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Plant Cell Environ. 15: 373-377.
- SINGLETON, W. UND D. JONES 1930: Heritable characters of maize. XXXV. Male sterile. J. Hered. 21: 266-268.
- SMALL, I., R. SUFFOLK UND C.J. LEAVER, 1989: Evolution of plant mitochondrial genomes via substoichiometric intermediates. Cell 58: 69-76.
- SMALL, I.D., E.D. EARLE, L.J. ESCOTE-CARLSON, S. GABAY-LAUGHNAN, J.R. LAUGHNAN UND C.J. LEVAER, 1988: A comparison of cytoplasmic revertants to fertility from different CMS-S maize sources. Theor. Appl. Genet. 76: 609-618.
- SMART, C.J., F. MONÉGER UND C.J. LEAVER, 1994: Nuclear restoration of cytoplasmic male sterility in sunflower is associated with the tissue-specific regulation of a novel mitochondrial gene. EMBO J. 13: 8-17.
- SMITH, B.M., 1993: F₁ hybrid leeks. Hort. Res. Int. Ann. Rep. 1992-1993: 62-63.
- SMITH, S.E., 1989: Biparental inheritance of organelles and its implications in crop improvement. Plant Breed. Rev. 6: 361-393.
- SODMERGEN, T., S. SUZUKI, S. KAWANO, S. NAKAMURA, S. TANO UND T. KUROIWA, 1992: Behavior of organelle nuclei (nucleoids) in generative and vegetative cells during

- maturation of pollen in *Lilium longiflorum* and *Pelargonium zonale*. Protoplasma 168: 73-82.
- SOFERMAN-AVSHALOM, O., V. YESODI, Y. TABIB, D. GIDONI, S. IZHAR UND N. FIRON, 1993: Detection of an open reading frame related to the CMS-associated urf-s in fertile *Petunia* lines and species and in other fertile *Solanaceae* species. Theor. Appl. Genet. 86: 308-311.
- SOLIMAN, K., G. FEDAK UND R.W. ALLARD, 1987: Inheritance of organelle DNA in barley and *Hordeum X Secale* intergeneric hybrids. Genome. 29: 867-872.
- SONG, J. UND C. HEDGCOTH, 1994a: Influence of nuclear background on transcription of a chimeric gene (*orf265*) and *coxI* in fertile and cytoplasmic male sterile wheats. Genome 37: 203-209.
- SONG, J. UND C. HEDGCOTH, 1994b: A chimeric gene (*orf256*) is expressed as protein only in cytoplasmic male-sterile lines of wheat. Plant Mol. Biol. 26: 535-539.
- Spirova, M., 1993: Effect of the cytoplasm from three sources of cytoplasmic male sterility on some quantitative characters in sunflower. Genetika i Seleksiya 26: 261-267.
- STEINBORN, R., A. WEIHE UND T. BÖRNER, 1992: Mitochondrial genome diversity within a cultivar of *Daucus carota* (ssp. *sativus*) revealed by restriction fragment analysis of single plants. Plant Breeding 109: 75-77.
- STERN, D.B. UND J.D. PALMER, 1984: Extensive and widespread homologies between mitochondrial DNA and chloroplast DNA in plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 1946-1950.
- SUBUDHI, K., R.P. BORKAKATI, S.S. VIRMANI UND N. HUANG, 1997: Molecular mapping of a thermosensitive genetic male sterility gene in rice using bulked segregant analysis. Genome 40: 188-194.
- TANDRE, K., V.A. ALBERT, A. SUNDAS UND P. ENGSTRÖM 1995: Conifer homologues to genes that control flower development in angiosperms. Plant Mol. Biol. 27: 69-78.
- TANG, H.V., R. CHANG UND D.R. PRING, 1998: Cosegregation of single genes associated with fertility restoration and transcript processing of *Sorghum* mitochondrial *orf107* and *urf209*. Genetics 150: 383-391.
- TANG, H.V., D.R. PRING, L.C. SHAW, R.A. SALAZAR, F.R. MUZA, B. YAN UND K.F. SCHERTZ, 1996a: Transcript processing internal to a mitochondrial open reading frame is correlated with fertility restoration in male-sterile *Sorghum*. Plant Journal 10: 123-133.
- TANG, H.V., D.R. PRING, F.R. MUZA UND B. YAN, 1996b: *Sorghum* mitochondrial *orf25* and a related chimeric configuration of a male-sterile cytoplasm. Curr. Genet. 29: 265-274.
- TANKSLEY, S.D., C.M. RICK UND C.E. VALLEJOS, 1984: Tight linkage between a nuclear male-sterile locus and an enzyme marker in tomato. Theor. Appl. Genet. 68: 109-113.
- TATLIOGLU, T., 1996: *Allium schoenoprasum* L. - A model plant for investigating the genetic and molecular basis of genic (GMS) and cytoplasmic male sterility (CMS). Proceedings of the International Symposium on Breeding Research on Medicinal And Aromatic Plants, Quedlinburg, Germany, June 30-July 4, 1996. Beiträge zur Züchtungsforschung 2: 146-149.

- TATLIOGLU, T., 1994: Genetische Analyse neuer Sterilitätsformen beim Schnittlauch (*Allium schoenoprasum* L.). Vortr. Pflanzenzüchtg 28: 146-148.
- TATLIOGLU, T., 1993: Cucumber, *Cucumis sativus* L. In: KALLOO, G. UND B.O. BERGH (eds.): Genetic improvement of vegetable crops. Pergamon Press, Oxford, U.K., 197-234.
- TATLIOGLU, T., 1987: Genetic control of temperature-sensitivity of cytoplasmic male sterility (cms) in chives (*Allium schoenoprasum* L.). Plant Breeding 99: 65-76.
- TATLIOGLU, T., 1986: Influence of tetracycline on the expression of cytoplasmic male sterility (cms) in chives (*Allium schoenoprasum* L.). Plant Breeding 97: 46-55.
- TATLIOGLU, T., 1985: Influence of temperature on the expression of cytoplasmic male sterility (cms) in chives (*Allium schoenoprasum*, L.). Z. Pflanzenzüchtg. 94: 156-161.
- TATLIOGLU, T., 1982: Cytoplasmic male sterility in chives (*Allium schoenoprasum* L.). Z. Pflanzenzüchtg. 89: 251-262.
- TATLIOGLU, T. UND G. WRICKE, 1988: Genetic control of tetracycline sensitivity of cytoplasmic male sterility (cms) in chives (*Allium schoenoprasum* L.). Plant Breeding 100: 34-40.
- TATLIOGLU, T., H. POTZ, B. RUGE UND R. SCHNEIDER, 1995: Male sterility in *Allium* species. In: WRICKE, G. UND U. KÜCK, (eds.): Genetic mechanisms for hybridbreeding, Adv. Plant Breeding 18: 17-88. Blackwell Wissenschaftsverlag.
- THIESSEN, G. UND H. SEIDLER, 1995: MADS-box genes in plant ontogeny and phylogeny: Haeckel's 'biogenetic law' revisited. Curr. Opin. Genet. Dev. 5: 628-639.
- THOMPSON, D.J., 1961: Studies on the inheritance of male-sterility in carrot, *Daucus carota* L. var. *sativa*. Proc. Am. Soc. Hortic. Sci. 78: 332-338.
- TILNEY-BASSETT, R.A.E., 1991: Genetics of variegation and maternal inheritance in ornamentals. Curr. Plant Sci. Biotech. Agric. 11: 225-249.
- TILNEY-BASSETT, R.A.E., 1974: The control of plastid inheritance in *Pelargonium* III. Heredity 33: 353-360.
- TILNEY-BASSETT, R.A.E., 1973: The control of plastid inheritance in *Pelargonium* II. Heredity 30: 1-13.
- TILNEY-BASSETT, R.A.E., A.B. ALMOUSLEM UND H.M. AMOATEY, 1992: Complementary genes control biparental plastid inheritance in *Pelargonium*. Theor. Appl. Genet. 85: 317-324.
- TODOROV T.V. UND M. TORDANOV, 1984: Possibilities of applying silver nitrate for the maintenance of tomato male sterile lines. Gradinar Lozar Nauka Hortic. Vitic. Sci. 21: 35-38.
- TSCHUIDA, S. UND S. IKEMOTO, 1993: Rapid detection of mitochondrial DNA polymorphism by photoactivatable biotin. Electrophoresis 14: 659-661.
- ULLSTRUP, A.J., 1972: The impact of the southern corn leaf blight epidemics of 1970-1971. Annu. Rev. Phytopath. 10: 37-50.
- UNSELD, M., J.R. MARIENFELD, P. BRANDT UND A. BRENNICKE, 1997: The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366,924 nucleotides. Nature Genetics 15: 57-61.

- VAUGHN, K.C., L.R. DEBONTE, K.G. WILSON UND G.W. SCHAEFFER, 1980: Organelle alteration as a mechanism for maternal inheritance. *Science* 208: 196-198.
- VITARD, V., R. DE PAEPE, C. MATHIEU, P. CHÉTRIT, UND F. VEDEL, 1992: Amplification of substoichiometric recombinant mitochondrial DNA sequences in a nuclear, male sterile mutant regenerated from protoplast culture in *Nicotiana glauca*. *Mol. Gen. Genet.* 233:193-200.
- VOLUEVICH, E.A. UND A.A. BULOICHIK, 1992: Nuclear-cytoplasmic interactions in the resistance of wheat to fungal pathogens. II. Effects of cultivated and wild cereal cytoplasms on the expression of the genome of the Leningradka variety during interaction with the floury mildew pathogen. *Sov. Genet.* 27: 1501-1505.
- WALTERS, T.W. UND E.D. EARLE, 1993: Organellar segregation, rearrangements and recombination in protoplast fusion-derived *Brassica oleracea* calli. *Theor. Appl. Genet.* 85: 761-769.
- WARD, B.L., R.S. ANDERSON UND A.J. BENDICH, 1981: The size of mitochondrial genome is large and variable in a family of plants (*Cucurbitaceae*). *Cell* 25: 793-803.
- WARMKE, H.E. UND S.L.J. LEE, 1977: Mitochondrial degeneration in Texas cytoplasmic male-sterile corn anthers. *J. Hered.* 68: 213-222.
- WEBER, E., 1986: Grundriß der biologischen Statistik. Gustav Fischer Verlag, Jena.
- WEIGEL, D., J. ALVAREZ, D.R. SMITH, M.F. YANOFSKY UND E.M. MEYEROWITZ 1992: *Leafy* controls floral meristem identity in *Arabidopsis*. *Cell* 69: 843-859.
- WEIHE, A., M. MEIXNER, B. WOLOWCZYK, R. MELZER UND T. BÖRNER, 1991: Rapid hybridisation-based assays for the identification by DNA probes of male-sterile and male-fertile cytoplasms of the sugar beet *Beta vulgaris* L. *Theor. Appl. Genet.* 81: 819-824.
- WESTERGAARD, M., 1958: The mechanism of sex determination in dioecious flowering plants. *Adv. Plant Genet.* 9: 217-281.
- WILSON, J.A. UND W.M. ROSS, 1962: Male sterility interaction of the *Triticum aestivum* nucleus and *Triticum timopheevi* cytoplasm. *Wheat Inf. Serv.* 14: 29-30.
- WINTZ, H., H.-C. CHEN, C.A. SUTTON, A. CONLEY, A. COBB, D. RUTH UND M.R. HANSON, 1995: Expression of the CMS-associated *urf-S* sequence in transgenic *Petunia* and tobacco. *Plant Mol. Biol.* 28: 83-92.
- WISE, R.P., C.L. DILL UND P.S. SCHNABLE, 1996: *Mutator*-induced mutations of the *rf1* nuclear fertility restorer of T-cytoplasm maize alter the accumulation of T-*urf13* mitochondrial transcripts. *Genetics* 143: 1383-1394.
- WISE, R.P., A.E. FLISS, D.R. PRING UND B.G. GENGENBACH, 1987a: Urf13-T of T cytoplasm maize mitochondria encodes a 13 kD polypeptide. *Plant Mol. Biol.* 9: 121-126.
- WISE, R.P., D.R. PRING UND B.G. GENGENBACH, 1987b: Mutation to male fertility and toxin insensitivity in Texas (T)-cytoplasm maize is associated with a frameshift in a mitochondrial open reading frame. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 2858-2862.
- WOLLARD, D.L., T.P. HERNANDEZ UND M.J. CONSTANTIN, 1985: Linkage of male sterility and potato-leaf shape and performance of F1 tomato hybrids (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Proc. La. Acad. Sci.* 48: 13-17.

- XUE, Y., S. COLLIN, D.R. DAVIES UND C.M. THOMAS, 1994: Differential screening of mitochondrial cDNA libraries from male-fertile and cytoplasmic male-sterile sugar-beet reveals genome rearrangements at *atp6* and *atpA* loci. *Plant Mol. Biol.* 25: 91-103.
- YAMATO, K., Y. OGURA, T. KANEGAE, Y. YAMADA UND K. OHYAMA, 1992: Mitochondrial genome structure of rice suspension culture from cytoplasmic male-sterile line (A-58 CMS): reappraisal of the master circle. *Theor. Appl. Genet.* 83: 279-288.
- YAN, J.Q., Q.H. XUE UND J. ZHU, 1996: Genetic studies of anther culture ability in rice (*Oryza sativa*). *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* 45: 253-258.
- YANG, X. UND A.J.F. GRIFFITHS, 1993: Plasmid suppressors active in the sexual cycle of *Neurospora intermedia*. *Genetics* 135: 993-1002.
- YIN, T. UND J.A. QUINN, 1995: Tests of a mechanistic model of one hormone regulating both sexes in *Cucumis sativus* (Cucurbitaceae). *Am. J. Bot.* 82: 1537-1546.
- YOUNG, E.G. UND M.R. HANSON, 1987: A fused mitochondrial gene associated with cytoplasmic male sterility is developmentally regulated. *Cell* 50: 41-49.
- YU, H.S., UND S.D. RUSSEL, 1994: Male reproduction development in *Nicotiana tabacum*: male germ unit associations and quantitative cytology during sperm maturation. *Sex. Plant Reprod.* 7: 324-332.
- YU, H.S. UND S.D. RUSSEL, 1992: Male cytoplasmic diminution and male germ unit in young and mature pollen of *Cymbidium goeringii*: a 3-dimensional and quantitative study. *Sex. Plant Reprod.* 5: 169-181.
- YUAN, S.C., Z.G. ZHANG, H.H. HE, H.L. ZEN, K.Y. LU, J.H. LIAN UND B.X. WANG, 1993: Two photoperiodic-reactions in photoperiod-sensitive genic male-sterile rice. *Crop Sci.* 33: 651-660.
- ZABALA, G., S. GABAY-LAUGHNAN UND J.R. LAUGHNAN, 1997: The nuclear gene Rf3 affects the expression of the mitochondrial chimeric sequence R implicated in S-type male sterility in maize. *Genetics* 147: 847-860.
- ZEVIANI, M., S. SERVIDEI, C. GELLERA, E. BERTINI, S. DI MAURO UND S. DI DONATO, 1989: An autosomal dominant disorder with multiple deletions of mitochondrial DNA starting at the D-loop region. *Nature* 339: 309-311.
- ZHANG Q., B.Z. SHEN, X.K. DAI, M.H. MEI, M.A.S. MAROOF UND Z.B. LI, 1994: Using bulked extremes and recessive class to map genes for photoperiod-sensitive genic male sterility in rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 8675-8679
- ZHANG S.Y., X.Y. ZHAO UND B.F. ZHOU, 1995: Breeding of interactive genic male sterile line 88-1A in Chinese cabbage. *Acta Hort.* 402: 259-262.
- ZHANG, X.P., B.B. RHODES, W.V. BAIRD, W.C. BRIDGES UND H.T. SKORUPSKA, 1996: Development of genic male-sterile watermelon lines with juvenile albino seedling marker. *Hort. Sci.* 31: 426-429.
- ZWEIFEL, S. UND W. FANGMAN, 1991: A nuclear mutation reversing a biased transmission of yeast mitochondrial DNA. *Genetics* 128:241-249.

11 Anhang

zu Kapitel 3:

In der Tabelle 11.1 sind die bei den fertilen Pflanzen des Basismaterials und den cytoplasmatisch sterilen und restorierten Genotypen festgestellten Hybridisierungsmuster dargestellt. Unterschiedliche Ziffern innerhalb einer Kombination von Endonuklease und jeweiliger mitochondrialer Sonde wurden bei den Pflanzen eingetragen, deren Hybridisierungsmuster sich unterscheiden ließen. War eine Differenzierung der Hybridisierungsmuster bei einer Kombination nicht möglich, wurde die Ziffer des kleinsten identischen Cytoplasmatyps eingetragen (z. B. für das in Abb. 3.3 gezeigte monomorphe Hybridisierungsmuster der Kombination *DraI* / *atpA* die Ziffer 1).

Tabelle 11.1: Unterscheidung der Hybridisierungsmuster bei fertilen Pflanzen des Basismaterials im Vergleich zu cytoplasmatisch männlich sterilen und restorierten Pflanzen

	W1115/ 47	Gr.9	111	Gr.7	2035/1	2010/9 (S)xx	7044/5 (S)xx	7044/6 (S)X.	2023/1	2023/ 16	4099/1
Restriktionsenzym: <i>DraI</i>											
<i>coxII</i>		1		3	3	4	4	4	5	5	
<i>coxIII</i>	1	1	1								1
<i>nad3</i>	1	1	1	3	3	4	4	4	5	5	5
<i>atpA</i>		1		1	1	1	1	1		1	
<i>atp6</i>		1		3	3	4	4	4	5	5	5
<i>atp9</i>	1	1	1	3	3	4	4	4		5	
<i>cob</i>		1		3	3	4	4	4	5	5	
<i>rrn18</i>		1		3	3	1	1	1		1	
Restriktionsenzym: <i>EcoRI</i>											
<i>coxII</i>		1			3	4			5	5	
<i>coxIII</i>	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2
<i>nad3</i>	1	1	1	3	3	4	4	4	5	5	5
<i>atpA</i>		1		3	3	4	4	4		5	
<i>atp6</i>	1	1	1	3	3	4	4	4	5	5	
<i>atp9</i>	1	1	1	3	3	4	4	4		5	
<i>cob</i>		1		3	3	4	4	4		5	
<i>rrn18</i>		1		3	3	4	4	4		4	
Restriktionsenzym: <i>HindIII</i>											
<i>coxII</i>		1		2	2	2	2	2			
<i>coxIII</i>	1	1	1								
<i>nad3</i>	1	1	1	3	3	4	4	4		5	5
<i>atpA</i>		1		3	3	4	4	4		5	
<i>atp6</i>	1	1	1	3	3	4	4	4		5	5
<i>atp9</i>	1	1	1	3	3	4	4	4		5	5
<i>cob</i>		1		1	1	1	1	1		1	
<i>rrn18</i>		1		3	3	1	1	1		1	

In der Tabelle 11.2 sind die Hybridisierungsmuster von spaltenden Nachkommenschaften der *wi*-, *st1*- und *st2*-Sterilität dargestellt. Bei Pflanzen, die bei der gleicher Kombination von Endonuklease und mitochondrialer Sonde ein identisches Hybridisierungsmuster mit einer der Pflanzen aus Tabelle 11.1 zeigten, wurde die Ziffer des kleinsten gemeinsamen Cytoplasmotyps eingetragen. Gleiche Zahlen in den beiden Tabellen bedeuten folglich identische Hybridisierungsmuster bei der jeweiligen Kombination von Endonuklease und mitochondrialer Sonde.

Tab. 11.2: Unterscheidung der Hybridisierungsmuster bei spaltenden Nachkommenschaften der *wi*-, *st1*- und *st2*-Sterilität

	10009/		11013/		11061/		11038/		7003/		10040/	
	26	3	103	64	20	98	17	26	95	3	16	12
	<i>wiwi</i>	<i>Wi.</i>	<i>wiwi</i>	<i>Wi.</i>	<i>wiwi</i>	<i>Wi.</i>	<i>wiwi</i>	<i>Wi.</i>	<i>st1st1</i>	<i>St1.</i>	<i>st2st2</i>	<i>St2.</i>
Restriktionsenzym: <i>DraI</i>												
<i>coxII</i>	1	1					2	2	2	2	5	5
<i>coxIII</i>	1	1	1	1	1	1	2	2				
<i>nad1</i>	1	1	1	1	1	1	2	2				
<i>nad3</i>	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	5	5
<i>atpA</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
<i>atp6</i>	1	1					2	2	2	2		
<i>atp9</i>	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2		
<i>cob</i>	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	5	5
<i>rrn18</i>	1	1					2	2	2	2		
Restriktionsenzym: <i>EcoRI</i>												
<i>coxII</i>	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2		
<i>coxIII</i>	1	1	1	1	1	1	2	2			2	2
<i>nad3</i>	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	5	5
<i>atpA</i>	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2		
<i>atp6</i>	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	5	5
<i>atp9</i>	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2		
<i>cob</i>	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	5	5
<i>rrn18</i>	1	1					2	2	2	2		
<i>rrn26</i>	1	1	1	1	1	1	1	1				
Restriktionsenzym: <i>HindIII</i>												
<i>coxII</i>	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2		
<i>coxIII</i>	1	1	1	1	1	1	2	2				
<i>nad1</i>	1	1	1	1	1	1	2	2				
<i>nad3</i>	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2		
<i>atpA</i>	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2		
<i>atp6</i>	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2		
<i>atp9</i>	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2		
<i>cob</i>	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1		
<i>rrn18</i>	1	1					2	2	2	2		
<i>rrn26</i>	1	1	1	1	1	1	1	1				
Restriktionsenzym: <i>EcoRV</i>												
<i>coxII</i>	1	1	1	1	1	1	2	2				
<i>coxIII</i>	1	1	1	1	1	1	2	2				
<i>nad1</i>	1	1	1	1	1	1	1	1				
<i>atpA</i>	1	1	1	1	1	1	2	2				
<i>cob</i>	1	1	1	1	1	1	2	2				
<i>rrn26</i>	1	1	1	1	1	1	1	1				

Fortsetzung von Tabelle 11.2

	10009/		11013/		11061/		11038/		7003/		10040/	
	26 <i>wiwi</i>	3 <i>Wi.</i>	103 <i>wiwi</i>	64 <i>Wi.</i>	20 <i>wiwi</i>	98 <i>Wi.</i>	17 <i>wiwi</i>	26 <i>Wi.</i>	95 <i>st1st1</i>	3 <i>St1.</i>	16 <i>st2st2</i>	12 <i>St2.</i>
Restriktionsenzym: <i>Bam</i> HI												
<i>coxII</i>	1	1	1	1	1	1	2	2				
<i>nad1</i>	1	1	1	1	1	1	1	1				
<i>atpA</i>	1	1	1	1	1	1	2	2				
<i>cob</i>	1	1	1	1	1	1	2	2				
<i>rrn26</i>	1	1	1	1	1	1	1	1				
Restriktionsenzym: <i>Rsa</i> I												
<i>atpA</i>	1	1	1	1	1	1	2	2				
<i>cob</i>	1	1	1	1	1	1	2	2				
<i>rrn26</i>	1	1	1	1	1	1	1	1				

zu Kapitel 4:

In den Tabellen 11.3-11.5 sind die Boniturdaten angegeben, die zur Analyse der maternalen Eltern dienen, welche bei den Kreuzungen zur Einlagerung der kerngenetischen Sterilitätsfaktoren in die verschiedenen Cytoplasmotypen verwendet wurden. Bei einzelnen Pflanzen konnte kein eindeutiger Bonitурwert zugeordnet werden. Diese Pflanzen wurden bei den Summenbildungen nicht berücksichtigt und sind in den Tabellen mit n.b. gekennzeichnet.

Tab. 11.3: Analyse der bei den Einlagerungen als Cytoplasmotyp (1) verwendeten Pflanze Gr.9

Selbstung von Gr.9			Bestäubung von (S) <i>xx</i> t (6025/35) durch Gr.9		
Einzelpflanzennummer der Nachkommenschaft 14007/	Bonitур bei den Temperaturstufen		Einzelpflanzennummer der Nachkommenschaft 14014/	Bonitур bei den Temperaturstufen	
	20°/12°C	24°/24°C		20°/12°C	24°/24°C
1	2 x 4 *		1	3 x 0	
2	2 x 4		2	4 x 4	6 x 4
3	1 x 4		3	5 x 0	3 x 0
4	3 x 4		4	5 x 4	1 x 4
5	2 x 4		5	5 x 0	1 x 0
7	1 x 4		6	3 x 4	4 x 4
8	2 x 4		7	3 x 4	
9	1 x 4		8	3 x 4	
10	2 x 4		9	4 x 4	
11	2 x 4		10	5 x 0	
12	2 x 4		11	1 x 0	2 x 0
13	1 x 4		12	2 x 4	
14	3 x 4		13	4 x 0	1 x 0
16	1 x 4		14	6 x 0	2 x 0
18	2 x 4		15	6 x 0	1 x 0
19	1 x 4		16	3 x 0 n.b.	3 x 0 n.b.
21	2 x 4			1 x 1 n.b.	
22	2 x 4			2 x 3 n.b.	
25	1 x 4		17	4 x 0	
26	2 x 4		18	2 x 4	5 x 4
27	1 x 4		19	4 x 0	1 x 0
30	1 x 4		20	3 x 4	1 x 4
31	2 x 4		21	6 x 4	4 x 4
34	2 x 4				
36	3 x 4				
38	3 x 4				
41	2 x 4				
43	1 x 4				
46	4 x 4				
51	1 x 4				
52	1 x 4				
53	1 x 4				
57	1 x 4				
59	1 x 4				
60	1 x 4				
Summe: (steril : fertil) Temp- : Temp+	0 : 35			10 : 10 6 : 0	6 : 7

* = erster Wert gibt die Zahl bonitierter Dolden an, der zweite die Boniturstufe (0 = steril, 4 = fertil).
Temp- = Temperatur-insensitiv, Temp+ = Temperatur-sensitiv

Tab. 11.4: Analyse der bei den Einlagerungen als Cytoplasmotyp (3) verwendeten Pflanze 2035/1

Selbstung von 2035/1			Bestäubung von (S)xxtt (6025/38) durch 2035/1		
Einzelpflanzennummer der Nachkommenschaft 14004/	Bonitur bei den Temperaturstufen		Einzelpflanzennummer der Nachkommenschaft 14013/	Bonitur bei den Temperaturstufen	
	20°/12°C	24°/24°C		20°/12°C	24°/24°C
3	1 x 4 *		1	3 x 0	4 x 0
7	1 x 4		2	3 x 0	2 x 0
9	1 x 4		3	4 x 0	1 x 0
10	2 x 4		4	3 x 0	4 x 0
14	1 x 4		5	4 x 0	
21	2 x 4		6	3 x 0	1 x 0
24	1 x 4		7	2 x 0	1 x 0
			8	3 x 0	1 x 0
			9	3 x 0	2 x 0
			10	4 x 0	3 x 0
			11	2 x 0	1 x 0
			12	2 x 0	3 x 0
			13	2 x 0	2 x 0
			14	3 x 0	4 x 0
			15	2 x 0	3 x 0
			16	3 x 0	3 x 0
			17	2 x 0	2 x 0
			18	2 x 0	3 x 0
			19	1 x 0	2 x 0
			20	3 x 0	1 x 0
			21	4 x 0	6 x 0
			22	2 x 0	3 x 0
			23	2 x 0	3 x 0
			24	1 x 0	4 x 0
			25	1 x 0	
			26	1 x 0	2 x 0
			27	1 x 0	1 x 0
			28	1 x 0	4 x 0
			29	1 x 0	2 x 0
			30	1 x 0	2 x 0
			31	1 x 0	2 x 0
			32	3 x 0	3 x 0
			33	1 x 0	1 x 0
			34	1 x 0	1 x 0
			35	1 x 0	3 x 0
Summe: (steril : fertil) Temp- : Temp+	0 : 6			35 : 0 33 : 0	33 : 0

* = erster Wert gibt die Zahl bonitierter Dolden an, der zweite die Boniturstufe (0 = steril, 4 = fertil).

Temp- = Temperatur-insensitiv

Temp+ = Temperatur- sensitiv

Tab. 11.5: Analyse der bei den Einlagerungen als Cytoplasmatyp (5) verwendeten Pflanze 2023/14

Selbstung von 2023/14			Bestäubung von (S)xttt (6025/8) durch 2023/14		
Einzelpflanzennummer der Nachkommenschaft 14006/	Bonitur bei den Temperaturstufen		Einzelpflanzennummer der Nachkommenschaft 14016/	Bonitur bei den Temperaturstufen	
	20°/12°C	24°/24°C		20°/12°C	24°/24°C
1	3 x 4 *	5 x 4	1	2 x 4	1 x 4
2	5 x 4	2 x 4	2	2 x 4	3 x 4
3	1 x 4	4 x 4	3	2 x 4 n.b.	2 x 0 n.b.
4	2 x 4	1 x 4	4	2 x 4	3 x 4
5	3 x 4 n.b.	10 x 0 n.b.	5	4 x 4 n.b.	3 x 0 n.b.
	1 x 0		6	4 x 0	2 x 0
8	9 x 4	3 x 4	7	2 x 0	1 x 1 n.b.
9	1 x 4 n.b.	4 x 0 n.b.		1 x 4 n.b.	1 x 4
	5 x 0	5 x 4	8	5 x 4 n.b.	2 x 0 n.b.
10	6 x 4		9	7 x 0	5 x 0
12	6 x 4	1 x 4	10	6 x 4	2 x 4
13	1 x 4		11	10 x 0	1 x 0
14	5 x 4	4 x 4	12	3 x 0	2 x 0
15	1 x 4	2 x 4	13	6 x 0	4 x 0
16	4 x 4	1 x 4	14	2 x 0	3 x 0
17	5 x 4	1 x 4	15	2 x 4	
18	6 x 0	1 x 4	16	3 x 4	2 x 4
		5 x 0 n.b.	17	2 x 0	1 x 4
19	4 x 4	2 x 4	18	5 x 0	3 x 0
20	1 x 4		19	1 x 4	3 x 4
21	6 x 4	8 x 4	20	3 x 0	1 x 0
22	6 x 0	5 x 0	21	2 x 0	7 x 0
23	4 x 4		22	3 x 0	3 x 0
24	4 x 4	8 x 4	23	6 x 4	3 x 4
25	3 x 4	9 x 4	24	3 x 0	1 x 0
26	2 x 0	5 x 0	25	1 x 0	4 x 0
27	10 x 4	8 x 4	26	3 x 0	2 x 4
28	2 x 4		27	3 x 0	1 x 4
29	2 x 4	3 x 4		1 x 4 n.b.	
30	5 x 4	1 x 4	28	1 x 1 n.b.	1 x 1 n.b.
31	3 x 0	2 x 0		1 x 4 n.b.	
32	5 x 4	3 x 4	29	2 x 0 n.b.	5 x 0 n.b.
33	2 x 4	3 x 4		3 x 3 n.b.	1 x 1 n.b.
34	5 x 0	5 x 4	30	13 x 0	5 x 0
35	1 x 0	4 x 4	31	4 x 4	2 x 4
36	5 x 4	4 x 4	32	3 x 4	1 x 0 n.b.
37	2 x 4	1 x 2 n.b.			1 x 1 n.b.
38	1 x 4				1 x 4
39	1 x 4	2 x 4	33	4 x 4	2 x 4
40	5 x 4	1 x 4	34	5 x 4	8 x 4
42	2 x 4	1 x 4	35	8 x 4	3 x 4
43	9 x 4	1 x 0 n.b.			
		2 x 4			
44	5 x 4				
45	1 x 0	3 x 4			
47	6 x 4	2 x 4			
48	7 x 4	3 x 4			
49	6 x 4	3 x 4			

Fortsetzung von Tabelle 11.5

Selbstung von 2023/14			Bestäubung von (S)xtt (6025/8) durch 2023/14		
Einzelplanzennummer der Nachkommenschaft 14006/	Bonitur bei den Temperaturstufen		Einzelplanzennummer der Nachkommenschaft 14016	Bonitur bei den Temperaturstufen	
	20°/12°C	24°/24°C		20°/12°C	24°/24°C
50	9 x 4	8 x 4			
51	7 x 4	5 x 4			
52	4 x 4	2 x 4			
53	5 x 4	3 x 4			
54	3 x 4				
55	6 x 4	2 x 4			
56	2 x 0	2 x 0			
57	4 x 4	1 x 4			
58	9 x 0	9 x 0			
59	6 x 4	4 x 4			
60	5 x 4	5 x 4			
61	4 x 4	3 x 0 ? n.b.			
62	4 x 4	1 x 4			
63	2 x 0	2 x 0			
64	2 x 0	3 x 0			
65	5 x 4	5 x 4			
66	6 x 4	2 x 4			
67	1 x 1	3 x 4			
68	5 x 4	3 x 4			
69	5 x 4	4 x 4			
70	1 x 4	2 x 4			
Summen:					
steril : fertil	14 : 51	7 : 46		17 : 13	13 : 16
Temp- : Temp+		7 : 7		13 : 4	

* = erster Wert gibt die Zahl bonitierter Dolden an, der zweite die Boniturstufe (0 = steril, 4 = fertil).

Temp- = Temperatur-insensitiv

Temp+ = Temperatur-sensitiv

zu Kapitel 8:

In der Tabelle 11.6 sind die Boniturwerte von Pflanzen der Linie 6025 bei 20°/12°C (Kontrolle) sowie bei Tetracyclinbehandlung und bei hohen Temperaturen (konstant 24°C) beschrieben. In der letzten Spalte ist der daraus abgeleitete Genotyp angegeben.

Tab. 11.6: Boniturwerte von CMS-Pflanzen der Linie 6025 zur Bestimmung ihres Genotyps bezüglich des A/a und T/t-Locus

Einzelpflanzen- Nummer	Bonitur bei der Kontrolle: 20°/12°C	Bonitur bei 20/12°C und Tetracyclin	Bonitur bei 24°/24°C	Genotyp
6025/ 2	2 x 0 *	1 x 0	3 x 0	(S) xx A. tt
6	1 x 0	-	1 x 4	(S) xx .. T.
11	1 x 0	2 x 4	-	(S) xx aa ..
12	3 x 0	1 x 0	-	(S) xx A. ..
14	1 x 0	7 x 0	2 x 4	(S) xx A. T.
16	1x0, 1x1	1x2, 2x4	-	(S) xx aa ..
19	1 x 1	-	1 x 4	(S) xx .. T.
21	2 x 0	6 x 0	4 x 0	(S) xx A.tt
22	2 x 0	3 x 0	1 x 4	(S) xx A. T.
23	5 x 0	8 x 0	4 x 0	(S) xx A. tt
24	2 x 0	9 x 0	3 x 0	(S) xx A. tt
25	5 x 0	4x2, 2x3, 4x4	8 x 4	(S) xx aa T.
26	7 x 0	6 x 0	6 x 4	(S) xx A. T.
27	5 x 0	1x2, 6x3, 5x4	3 x 4	(S) xx aa T.
28	3 x 0	7x0, 1x1	3 x 4	(S) xx A. T.
29	1x0, 1x1, 1x3	18 x 4	20 x 4	(S) xx aa T.
30	-	4 x 0	10 x 4	(S) xx A. T.
32	1 x 1, 1 x 2	2 x 4	2 x 4	(S) xx aa T.
35	1 x 0	1 x 0	-	(S) xx A.
42	1 x 0	-	1 x 4	(S) xx .. T.
43	1 x 0	2 x 0	-	(S) xx A. ..
46	1 x 0	3 x 0	-	(S) xx A. ..
48	2 x 0	2x0, 1x1, 1x3	2 x 4	(S) xx A. T.
49	3x2, 1x3	12 x 4	5 x 4	-
50	4 x 0	-	1 x 0	(S) xx .. tt
51	3 x 1	7 x 4	4 x 4	(S) xx aa T.
52	7 x 0	1 x 0	3 x 0	(S) xx A. tt
53	7 x 0	2 x 0	2 x 0	(S) xx A. tt
54	3 x 0	4 x 0	1 x 0	(S) xx A. tt
55	3 x 0	3 x 0	1 x 4	(S) xx A. T.
56	8 x 0	2x3, 5x4	5 x 4	(S) xx aa T.
57	5 x 0	7 x 0	5 x 0	(S) xx A. tt
58	4 x 0	5 x 0	2 x 4	(S) xx A. T.
59	6 x 0	4 x 0	2 x 0	(S) xx A. tt
60	8 x 0	4 x 0	2x3, 3x4	(S) xx A. T.
61	1 x 0	5 x 0	3 x 4	(S) xx A. T.
62	3 x 4	6 x 4	5 x 4	-
63	9 x 0	7 x 0	4 x 0	(S) xx A. tt
64	1 x 0	10 x 0	11 x 4	(S) xx A. T.
65	1 x 0	-	6 x 0	(S) xx .. tt
67	3 x 0	4x0, 1x1	13 x 4	(S) xx A. T.
69	4 x 3-4	9 x 4	5 x 4	-
70	6 x 0	-	1 x 0	(S) xx .. tt
71	1 x 4	7 x 4	4 x 4	(S) xx
72	1 x 0	-	5 x 4	(S) xx .. T.
73	1x0, 1x1, 1x3, 1x4	10 x 4	7 x 4	-
74	6 x 0	3 x 0	3 x 0	(S) xx A. tt

Fortsetzung von Tabelle 11.6

Einzelpflanzen- Nummer	Bonitur bei der Kontrolle: 20°/12°C	Bonitur bei 20/12°C und Tetracyclin	Bonitur bei 24°/24°C	Genotyp
75	3 x 0	-	6 x 0	(S) xx .. tt
76	3 x 0	3x0, 3x4	6 x 4	(S) xx aa T.
77	4 x 0	5 x 0	2 x 0	(S) xx A. tt
78	1 x 0	-	1 x 0	(S) xx .. tt
79	3 x 3	5 x 4	18 x 4	-
80	13 x 0	6 x 0	3 x 0	(S) xx A. tt
81	4 x 0	4 x 0	9 x 4	(S) xx A. T.
82	2 x 0	2x0, 4x4	6 x 4	(S) xx aa T.

* = erster Wert gibt die Zahl bonitierter Dolden an, der zweite die Boniturstufe (0 = steril, 4 = fertil).

Anmerkung: Bei Kontrollboniturwerten von 2 und mehr wurde kein Genotyp bestimmt, da nicht klar ist, warum diese Pflanzen zur Bildung von Pollen neigen.

12 Danksagung

Mit der Vorlage der Dissertation verbinde ich meinen Dank an Herrn Prof. Dr. Tatlioglu für die Überlassung des Themas und seiner stetigen Bereitschaft, neue Ideen zu diskutieren und zu fördern.

Besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr.Dr.h.c. Friedt für die Übernahme des Korreferates.

Weiterhin möchte ich allen Mitarbeitern, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, danken. Insbesondere gilt dies für Frau Ingrid Robotta, die es durch großes Engagement ermöglicht hat, die Forschungsarbeit in der Zeit der Umstrukturierungen und Mittelkürzungen am Institut weiterzuführen.

Auch den studentischen Hilfskräften Silke Hoffmann und Christof Diertrich danke ich für ihre geduldige Arbeit bei der Erhaltung der *in vitro*-Kulturen und für ihre vielfältige Unterstützung bei der Literaturrecherche. Herrn Heiko Mibus danke ich für die Unterstützung, die er mir zunächst als studentische Hilfskraft und später als wissenschaftlicher Mitarbeiter durch seine stete Diskussionsbereitschaft zu Teil werden ließ. Frau Susanne Hülsmann danke ich für die im Rahmen ihrer Diplomarbeit durchgeführten cytologischen Untersuchungen, deren Ergebnisse zur Abrundung der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Herrn Robin Hodgson danke ich für seine persönliche Unterstützung und seiner Hilfe bei der Einrichtung meines Computers.

Nicht zuletzt gilt der Dank meinen Eltern, die mich in vielfältiger Weise unterstützt haben, und allen Freunden, die mich auf dem Weg begleitet haben, und denen ich nicht immer die Zeit zukommen lassen konnte, die sie verdient gehabt hätten.

Die vorliegende Arbeit wurde aus Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert.

13 Lebenslauf

Name: Thomas Engelke
geboren: 03.12.1968 in Holzminden
Familienstand: ledig



Schulbildung:
 1975 – 1979: Grundschule Kirchbrak
 1979 – 1981: Orientierungsstufe Bodenwerder
 1981 – 1988: Gymnasium an der Wilhelmstraße in Holzminden
 Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Grundwehrdienst:
 1988 – 1989: Sanitätsbataillon 1, Ausbildungskompanie in Hildesheim

Studium:
 1989 – 1994: Studium der Gartenbauwissenschaften, Universität Hannover
 Abschluß: Dipl.-Ing. agr.

seit Febr. 1995: Promotionsstudent am Institut für Angewandte Genetik (spätere Abteilung Angewandte Genetik im Institut für Zierpflanzenbau, Baumschule und Pflanzenzüchtung), Universität Hannover

Berufstätigkeit:
 seit Febr. 1995: Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Angewandte Genetik (spätere Abteilung Angewandte Genetik im Institut für Zierpflanzenbau, Baumschule und Pflanzenzüchtung), Universität Hannover