

1 Einleitung

Die Sonnenblume gehört neben dem Raps und der Sojabohne zu den wichtigsten Ölpflanzen der Welt. Das Entstehungszentrum der Gattung *Helianthus* liegt in Nordamerika. Im 16. Jh. wurde die Sonnenblume von spanischen Eroberern nach Europa gebracht. Heute wird sie vor allem in den südlichen und südöstlichen Teilen Europas angebaut. In Deutschland lag der Sonnenblumenanbau im Jahr 1994 bei einem Rekordstand von 190 000 ha, der seither jedoch nicht wieder erreicht wurde (FAO, <http://apps.fao.org/> 2003).

Die Hybridzüchtung der Sonnenblume beruht auf einem cytoplasmatisch-männlichen Sterilitätssystem, genauer auf einer cytoplasmatisch-kerngenisch-männlichen Sterilität (CMS), welche durch eine Inkompatibilität zwischen Kern- und Mitochondrien-Genen bedingt ist. Es handelt sich um einen maternal vererbten Phänotyp.

Weltweit wird in der Sonnenblumenzüchtung das sogenannte PET1-Plasma eingesetzt, das auf eine interspezifische Kreuzung von *H. petiolaris* mit *H. annuus* zurückgeht (LECLERCQ 1969). Das Sterilitätssystem umfasst den Aufbau cytoplasmatisch-männlich-steriler Linien, deren männlich-fertile Erhalterlinien (Maintainer) und väterliche Restorerlinien zur Wiederherstellung der Pollenfertilität in den F₁-Hybriden. Im Idealfall erfolgt die Restauration der Pollenfertilität bei Vorliegen von CMS-Plasmen durch ein dominantes Restorer-gen im Kern-genom. Auch bei anderen Kulturpflanzen wie z.B. Reis, Roggen und Raps gewinnt die auf CMS-Systemen basierende Hybridzüchtung zunehmend an Bedeutung (LAPORTE *et al.* 1998).

In der vorliegenden Sonnenblumenkreuzung RHA325(cms) x HA342, die für die Positionsklonierung des Restorergens *Rf1* verwendet wurde, liegt ebenfalls das PET1-Plasma vor. Nach SERIEYS (1996) können bei CMS-Plasmen je nach Kreuzungskombination bis zu vier Restorer-gene für die Aufhebung der männlichen Sterilität verantwortlich sein. In der vorliegenden Kreuzung spaltet allein das *Rf1*-Gen für die Wiederherstellung der Pollenfertilität auf. Bisher weiß man noch sehr wenig über die Wirkungs- und Funktionsweise dieses Restorergens. Neben dem Restorer-gen spaltet die Population auch für das Plasmopara-Resistenzgen *Pl₂*.

Um die Funktion eines Gens aufzuklären, ist es erforderlich, das Gen, z.B. über markergestützte Klonierung, zu isolieren. Hierzu wurden im vorliegenden Fall

Kopplungsanalysen zwischen molekularen Markern und dem Restorergeren *Rf1* durchgeführt, die eine Identifizierung von eng gekoppelten Markern erlauben, welche anschließend für das Screening einer BAC-Bibliothek (ÖZDEMIR *et al.* 2002) eingesetzt wurden.

Das Restorergeren *Rf1* wurde bereits von BERRY *et al.* (1995) anhand von RFLP-Markern auf deren Kopplungsgruppe 13 kartiert. Die mit dem *Rf1*-Gen gekoppelten RFLP-Marker liegen 9 bzw. 20 cM vom Gen entfernt.

Die Absättigung der *Rf1*-Region mit molekularen Markern stellt eine wesentliche Voraussetzung für die Klonierung des Gens dar. Um diese Region mit Markern abzusättigen stehen heute eine Reihe von molekularen Markertechniken zur Verfügung. Vor allem die AFLP-Technik (Amplified Fragment Length Polymorphism) hat sich als PCR-gestützte Methode zur Markerabsättigung in den letzten Jahren etabliert (VOS *et al.* 1995, ZABEAU & VOS 1993). Bei einigen Nutzpflanzen, wie z.B. der Zuckerrübe (SCHONDELMAIER *et al.* 1996), der Gerste (BECKER *et al.* 1995), der Kartoffel (MEKSEM *et al.* 1995) und der Sojabohne (LIN *et al.* 1996) konnten im Vergleich zu RFLP- und RAPD-Analysen (LANDRY *et al.* 1987, BERRY *et al.* 1995, GENTZBITTEL *et al.* 1994, SCHULZ *et al.* 1994, LEON *et al.* 1995, LIN *et al.* 1996) mit der AFLP-Technik wesentlich schneller als zuvor eng gekoppelte Marker identifiziert werden. Neben AFLP-Markern eignen sich vor allem SSR-Marker sehr gut, um verschiedene Karten miteinander zu vergleichen (YU *et al.* 2003).

In der vorliegenden Arbeit konnten eng mit dem Restorergeren gekoppelte Marker identifiziert werden. Im Intervall von 1,1 cM um das Restorergeren kartieren 5 Marker. Der Marker E33M61_{136R}, der in 0,3 cM Abstand auf der distalen Seite kartiert, sowie K13₄₅₄ in 0,8 cM auf der proximalen Seite wurden als Ausgangsmarker für die Identifizierung von positiven BACs verwendet. Es konnte somit die Erstellung eines Contig für den Restorergerenlocus begonnen werden.

Durch die Markerabsättigung der *Rf1*-Region mit AFLP-Markern kann zum einen ein Beitrag zur Genisolierung geleistet und zum anderen der praktischen Züchtung ein Werkzeug für die markergestützte Selektion an die Hand gegeben werden. Durch die Contigerstellung wurde die Basis dafür gelegt, das Restorergeren näher zu untersuchen und mehr über seine Funktion herauszufinden.

2 Literaturübersicht

2.1 Verbreitung und Systematik der Gattung *Helianthus*

Während im Jahr 1970 in der Europäischen Union noch etwa 204 000 ha mit Sonnenblumen angebaut wurden (FAO 2003), stiegen die Anbauzahlen im Jahr 1993 bis auf rund 3 Mio. ha an. Im Jahre 2002 beliefen sich die Anbauflächen nur noch auf etwa 1,7 Mio. ha, davon 26 000 ha in Deutschland (FAO 2003).

Als Entstehungszentrum der Gattung *Helianthus* wird der Westen des nordamerikanischen Kontinents zwischen Nordmexiko und Nebraska angesehen. Von dort aus erfolgte eine Verbreitung nach Nord- und Südamerika (HUGGER, 1989). Im 16. Jh. wurde die Sonnenblume von den spanischen Eroberern nach Europa gebracht, wo sie heute vor allem im Süden und Südosten angebaut wird (SCHUSTER 1993).

Die Sonnenblume gehört zur Familie der *Compositae* Adams (Syn. *Asteraceae*), Unterfamilie *Tubuliflorae* DC., Tribus *Helianthineae* Cars, Gattung *Helianthus* L. (SCHUSTER 1993). Nach einer von HEISER (1978) vorgeschlagenen und von der FAO 1982 übernommenen Klassifizierung gliedert sich die Gattung *Helianthus* in vier Sektionen: *Annui*, *Ciliares*, *Divaricati* und *Fruticosi*. Für die von HEISER (1978) vorgeschlagene vierte Sektion *Fruticosi* wurde mittlerweile eine eigene Gattung, *Helianthopsis*, eingeführt. Sie umfaßt 17 mehrjährige, buschförmige Arten aus dem südamerikanischen Genzentrum, die mit den übrigen Sektionen der Gattung *Helianthus* nur sehr entfernt verwandt sind (HUGGER 1989).

Die vier von SCHILLING & HEISER (1981) eingeführten Sektionen stellen sich wie folgt dar:

Annui: Diese Sektion umfaßt 11 Arten, die vorwiegend aus dem Südwesten Nordamerikas stammen. Diese sind einjährig und haben einen diploiden Chromosomensatz ($2n = 2x = 34$). Zu dieser Sektion gehört auch die Kultursonnenblume *Helianthus annuus*.

Ciliares: Die Selektion *Ciliares* enthält sechs perennierende Arten, welche sich in zwei Serien, *Ciliares* und *Pumili*, einteilen lassen. Das Verbreitungsgebiet liegt in Mexiko und im westlichen Nordamerika. Fünf Arten sind diploid ($2n = 2x = 34$). Die sechste Art, *H. ciliaris*, liegt sowohl als tetraploide ($2n = 4x = 68$) als auch als hexaploide ($2n = 6x = 102$) Form vor.

Divaricati: Diese Sektion ist mit 31 perennierenden Arten, welche vorwiegend im Zentrum und im Osten der USA vorkommen, die umfangreichste. Zwanzig Arten weisen einen diploiden Chromosomensatz auf, drei Arten sind tetraploid, sechs Spezies hexaploid, eine Art kommt di- und tetraploid, eine weitere Art tetra- und hexaploid vor. In diese Sektion gehört auch Topinambur (*H. tuberosus*).

Agrestes: Die Sektion *Agrestes* umfaßt nur eine einzige annuelle Art, *H. agrestis*, mit diploidem Chromosomensatz ($2n = 34$).

In der landwirtschaftlichen Praxis sind zwei Arten von Bedeutung. Dies ist zum einen die Kultursonnenblume (*H. annuus* L.) und zum anderen die Topinambur (*H. tuberosus* L.). Andere Arten werden auch als Zierpflanzen kultiviert.

2.2 Überblick zu *Plasmopara halstedii*, Erreger des Falschen Mehltaus der Sonnenblume

2.2.1 Der Pilz *Plasmopara halstedii*

Der Pilz *Plasmopara halstedii* verursacht eine der wichtigsten Krankheiten der Sonnenblume, den Falschen Mehltau. Sein ursprüngliches Verbreitungsgebiet liegt wie das der Sonnenblume in Nordamerika und wurde vermutlich über infiziertes Saatgut weltweit ausgebreitet (VIRAYNI 1992, SACKSTON 1981). Der Erreger wird in verschiedene Pathotypen bzw. Rassen eingeteilt. Um eine international einheitliche Benennung der einzelnen Pathotypen zu gewährleisten, hat GULYA (1995) ein Testsystem vorgeschlagen, das auf einen ursprünglich von LIMPET & MÜLLER (1994) entwickelten Triplett-Code zurückgeht. Anhand einer Auswahl von neun verschiedenen Sonnenblumen-Differentiallinien erfolgt die Charakterisierung und Benennung der Pathotypen. Anhand der Darstellung des Virulenzmusters der Pathotypen in Form einer mehrstelligen Codenummer läßt sich die Reaktion der verwendeten Differentiallinien auf das charakterisierende *P. halstedii*-Isolat ablesen.

Die hierbei eingesetzten Differentiallinien bestehen aus drei Sets von je drei Linien (3 x 3 System). Für jede sensitive Reaktion (S) werden je nach Linie verschiedene Ziffern vergeben. Aus den Summen der Ziffern innerhalb eines jeden Sets leitet sich der dreistellige Code ab, der den Pathotyp bezeichnet. Durch die Festlegung der verwendeten Differentiallinien ist ein internationaler Vergleich

möglich. Die Tabelle 1 gibt einen Überblick über die Reaktion verschiedener Sonnenblumen-Differentiallinien gegenüber bekannten Pathotypen von *P. halstedii*.

Wird eine Pflanze mit dem Erreger des Falschen Mehltaus infiziert, so spielen verschiedene Faktoren, wie das Alter der Pflanze zum Infektionszeitpunkt, die Wirt-Pathogen-Interaktion, die Luftfeuchtigkeit, die Temperatur und die Art und Konzentration des Inokulums bei der Ausprägung der Symptome eine Rolle.

Tabelle 1: Reaktion verschiedener Sonnenblumen-Differentiallinien gegenüber bekannten Pathotypen von *P. halstedii* (TOURVIELLE DE LABROUHE *et al.* 2000, GULYA *et al.* 1998).

Sonnenblumen-Differentiallinien	#	Frühere Rassebezeichnung											Französische Isolate				
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	A	B	C	D	
Set 1																	
HA304	(1)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
RHA265	(2)	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
RHA274	(4)	R	R	S	S	S	R	R	S	R	S	S	S	S	S	R	R
Set 2																	
PM13	(1)	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	R	R	R
PM17	(2)	R	R	R	S	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R
803-1	(4)	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Set 3																	
HAR4	(1)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	R	R
QHP1	(2)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R
HA335	(3)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Triplett-Code-System																	
Set 1 Σ		1	3	7	7	7	3	3	7	3	7	7	7	7	7	3	3
Set 2 Σ		0	0	0	3	7	1	3	1	3	0	1	1	0	0	0	0
Set 3 Σ		0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	0	3	0	0	0

Ziffern, die die Anfälligkeit der entsprechenden Differentiallinien codieren

Je nach Ausbreitung des Pathogens innerhalb der Pflanze unterscheidet man zwischen verschiedenen Infektionsformen: systemische, latente und lokale Infektion. Unter feuchten Witterungsbedingungen weisen die Blätter infizierter Pflanzen auf der Unterseite einen weißlichen Belag auf. Dieser wird auch Mehltau genannt. Die jüngeren Blätter sind starr und nach unten eingerollt. Durch Verkürzung des Stengels zeigen systemisch infizierte Pflanzen auffälligen Zwergwuchs. Außerdem unterbleibt die Neigung des Korbes während der Reife, so dass systemisch infizierte Pflanzen durch eine charakteristische aufrechte Korbhaltung auffallen (VIRANYI 1992, SACKSTON 1981). Werden die Pflanzen schon im Keimlingsstadium befallen, so kann es zum frühen Absterben der Keimlinge kommen (VIRANYI 1992). Werden die Pflanzen nur lokal infiziert, kann dieser Befall anhand chlorotischer Flecken festgestellt werden. Die Ausbreitung des Pilzes bleibt hier örtlich begrenzt und die Wirtspflanze kann sich „normal“ entwickeln.

Unabhängig davon, ob eine Pflanze gegen das Pathogen anfällig oder resistent ist, wird sie von ihm besiedelt. Erst nach erfolgter Infektion finden hypersensitive Reaktionen und anschließende Nekrosenbildung im Bereich der Pilzhyphen statt (VIRANYI & DOBROVOLSZKY 1980, MOUZEYAR *et al.* 1994, GRAY & SACKSTON 1985, VIRANYI & GULYA 1996, HELLER *et al.* 1997). Die Resistenz kann nach MOUZEYAR *et al.* (1994) anhand der Ausbreitung des Pathogens innerhalb der Pflanze in zwei Gruppen (Typ I, Typ II) eingeteilt werden. Bei Typ I ist das Pathogenwachstum auf die Wurzeln und die basalen Teile des Hypokotyls limitiert. Bei der Typ II-Resistenz hingegen wächst das Pathogen durch das gesamte Hypokotyl bis in den Bereich der Kotyledonen und kann dann anschließend auf den Kotyledonen sporulieren (*cotyledon limited infection*) (SACKSTON, 1992).

Die Anzahl der Pflanzen, die pro Anbaufläche infiziert werden, ist abhängig von der Aggressivität des Inokulums, der Sonnenblumensorte und der Niederschlagsmenge nach der Aussaat. Sie kann bis zu 95% betragen (VIRANYI 1992). Daraus resultiert eine Ertragsreduktion, da weniger Pflanzen auf der Parzelle zur Ernte stehen und die infizierten Pflanzen, welche zur Reife gelangen, ein reduziertes Tausend-Korn-Gewicht (TKG) sowie einen erhöhten Schalenanteil aufweisen. Der Ölgehalt im Samen befallener Pflanzen kann bis auf 50% des Normalgehalts zurückgehen (VIRANYI 1992, SACKSTON 1981).

Plasmopara halstedii zeichnet sich durch eine obligat biotrophe Ernährungsweise aus. Zur Anzucht des Pilzes ist daher immer lebendes Pflanzengewebe notwendig, wobei im Labor entweder junge Sonnenblumenkeimlinge oder auch Blattscheiben inokuliert werden (SACKSTON & VIMARD 1988). Der Pilz zeigt einen für Oomyceten typischen Lebenszyklus. Dabei ist die Fortpflanzung des Pathogens auf sexuellem wie auch auf vegetativem Wege möglich. Meiotisch gebildete, aus sogenannten Oosporen hervorgegangene Zoosporen können die Wirtspflanze über den Boden infizieren. Nach Ausbreitung in der Pflanze treten unter geeigneten Witterungsverhältnissen vegetative Verbreitungseinheiten aus den Spaltöffnungen der Blätter aus. Diese Sporangien können durch den Wind verbreitet werden und auf Blätter benachbarter Pflanzen gelangen. Auch durch Freisetzung vegetativ gebildeter Zoosporen kann eine Infektion über die Blätter erfolgen.

2.2.2 Resistenzgene gegen *Plasmopara halstedii*

Für die Sonnenblume wurden bis zu 16 verschiedene monogen dominante *PI*-Resistenzgene gegen den Erreger des Falschen Mehltaus postuliert (SACKSTON *et al.* 1990, VIRANYI & GULYA 1995, KORELL *et al.* 1996, ZIMMER & KINMANN 1972, MILLER & GULYA 1987, MILLER & GULYA 1991, TAN *et al.* 1992, MILLER 1992). Die dominanten Resistenzgene sind in *Helianthus*-Wildarten und daraus abgeleiteten Linien zu finden (SEILER 1992; GEORGIEVA-TODOROVA 1984, LIU *et al.* 1996, LAMBERT *et al.* 1998; FAUVRE *et al.* 1998, SEILER 1998). Die Tabelle 2 gibt einen Überblick über die bekannten *PI*-Gene und die entsprechenden Sonnenblumenlinien, in denen diese zu finden sind. Die aktuellen Forschungsergebnisse lassen vermuten, dass zumindest einige dieser Gene in der gleichen Genregion clustern oder aber allelisch sind (BERT *et al.* 2001, BOUZIDI *et al.* 2002). So konnten BERT *et al.* (2001) zeigen, dass die Resistenzgene *PI*₅ und *PI*₈ eng miteinander gekoppelt sind und unterhalb des Restorergens *Rf1* auf der Kopplungsgruppe 6 sowie in der Nähe von *PI*₆ und *PI*₇ auf der Kopplungsgruppe 1 (nach BERT *et al.* 2001) liegen. VEAR *et al.* (1997) haben ebenfalls auf Kopplungsgruppe 1 die Resistenzgene *PI*₂, *PI*₁ und *PI*₆ in sehr dichtem Abstand zueinander kartiert. Das lässt vermuten, dass es sich im Fall des *PI*₆-Gens nicht um ein einzelnes Gen

handelt, sondern um ein Gencluster. Abweichend von den Arbeiten der französischen Arbeitsgruppe (BERT *et al.* 2001) kartierte eine amerikanische Gruppe GEDIL *et al.* (2001) das *PI₇*-Gen auf Kopplungsgruppe 8.

Tabelle 2: Übersicht zu Resistenzgenen gegen *Plasmopara halstedii*, deren Quellen, sowie den Pathogenrassen, gegen die diese Gene wirken.

Gene	Rasse	Quelle	Zitat
<i>PI₁</i> (<i>PI</i>)	100	AD66	VRANCEANU & STOENENESCU 1970
<i>PI₂</i> (<i>PI₄</i>)	100,300	HA61	ZIMMER & KINMAN 1972
<i>PI₃</i>	100,300	HA61	ZIMMER & KINMAN 1972, VEAR & LECLERCQ 1971
<i>PI₅</i>	700	RF-5566-74	VRANCEANU <i>et al.</i> 1981
<i>PI₆</i>	100,300,310, 330,700,730,770	HA335, HA336	MILLER & GULYA 1991
<i>PI₇</i>	100,300,310, 330,700,730,770	HA337-339	MILLER & GULYA 1991
<i>PI₈</i>	100,300,310, 330,700,730,770	RHA340	MILLER & GULYA 1991
<i>PI₉</i>	310	RHA274	GULYA <i>et al.</i> 1991
<i>PI₁₀</i>	330	RHA325, RHA274	GARCIA 1991
<i>PI_t</i> (<i>PI₅</i>)		<i>H. tuberosus</i>	PUSTOVOIT & KROKHIN 1977
<i>PI_t</i> (<i>PI₂</i>)		<i>H. tuberosus</i>	BURLOV & ARTEMENKO 1983
<i>PL_{4a1-4}</i>	730	<i>H. annuus</i> PI413047 PI413131 PI413157 PI413161	TAN <i>et al.</i> 1991
<i>PI_{2a1}</i>	300	<i>H. annuus</i> PI413078	JAN <i>et al.</i> 1991

Die Einteilung der Kopplungsgruppen der französischen Gruppen unterscheidet sich von derjenigen um S. Knapp (GEDIL *et al.* 2001). Letztgenannte Gruppe konnte zeigen, dass das *Pl₇*-Gen eine *Nucleotide-Binding-Site* (NBS) beinhaltet. Diese Kopplungsgruppen beinhalten RFLP- und SSR-Marker, die nun anhand der Veröffentlichung von YU *et al.* (2003) mit anderen Karten vergleichbar sind. BOUZIDI *et al.* (2002) konnten über Klonierung und Sequenzanalysen nachweisen, dass das *Pl₆*-Gen eine konservierte Genregion enthält, die zu der Gruppe der TIR-NBS-LRR Resistenzgenklasse gehören. Ein Überblick über die verschiedenen Resistenzgenklassen und ihre Wirkungsweise findet sich im Übersichtsartikel von HAMMOND-KOSACK & PARKER (2003).

2.3 Überblick über Cytoplasmatisch-Männliche Sterilitäts-Systeme (CMS)

Seit der Entdeckung von CMS bei der Sonnenblume durch LECLERCQ (1969) wurden über 70 neue CMS-Plasmen in der Gattung *Helianthus* entdeckt (SERIEYS 1996, 1999). Das ursprüngliche CMS-System, auch „französisches Cytoplasma“ genannt, das auf *H. petiolaris* Nutt. zurückgeht, wird gemäß FAO-Code auch PET1-Plasma genannt. Daneben sind noch eine Reihe weiterer CMS-Plasmen aus Kreuzungen mit annualen Wildarten wie z.B. *H. neglectus*, *H. argophyllus* oder *H. exilis* entstanden (SERIEYS 1996). Mehrjährige Arten wie *H. giganteus* oder *H. rigidus* trugen ebenfalls zur Entdeckung von neuen CMS-Plasmen bei. Die letztgenannten CMS-Plasmen spielen aufgrund der geringen Kreuzbarkeit zwischen der Kulturform *H. annuus* und den mehrjährigen Arten eine sehr geringe Rolle in der Sonnenblumenzüchtung.

Molekulare Kenntnisse über die verschiedenen CMS-Plasmen sind für die Erweiterung der genetischen Basis auf der cytoplasmatischen Seite der Sonnenblume unabdingbar. Entsprechende Arbeiten wurden von HORN & FRIEDT (1999) und HORN (2002) für 28 neue CMS-Plasmen durchgeführt. Für den Einsatz neuer Plasmen in der Züchtung ergeben sich Probleme aus der zum Teil beobachteten Umweltinstabilität der CMS-Plasmen und dem Fehlen entsprechender Maintainer- oder Restorerlinien.

Die bisher entdeckten CMS-Plasmen (über 70) kann man nach ihrer Entstehung in vier große Gruppen einteilen (Tab. 3 und 4).