



(10) **DE 10 2016 015 741 A1** 2017.11.30

(12)

Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2016 015 741.0**

(22) Anmeldetag: **12.04.2016**

(43) Offenlegungstag: **30.11.2017**

(51) Int Cl.: **A01H 1/06 (2006.01)**

(62) Teilung aus:
10 2016 106 656.7

(71) Anmelder:
KWS SAAT SE, 37574 Einbeck, DE

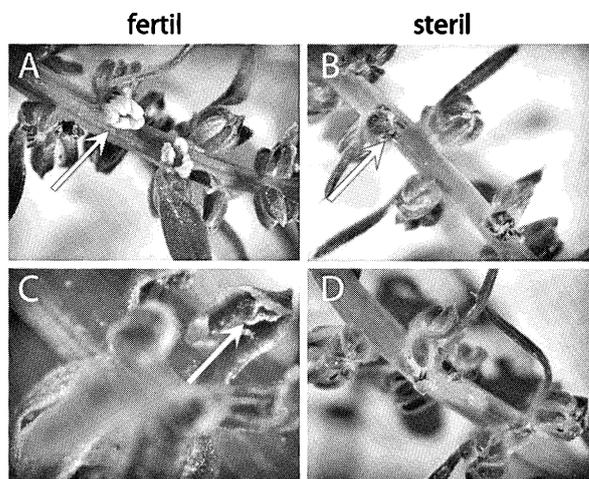
(72) Erfinder:
Mechelke, Wolfgang, Dr., 37574 Einbeck, DE;
Borchardt, Dietrich, Dr., 37574 Einbeck, DE;
Czarnecki, Olaf, Dr., 13086 Berlin, DE

Prüfungsantrag gemäß § 44 PatG ist gestellt.

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen.

(54) Bezeichnung: **Kernkodierte männliche Sterilität durch Mutation in Cytochrom P450 Oxidase**

(57) Zusammenfassung: Bereitgestellt werden Pflanzen mit einem kernkodierte, rezessiven, männlich sterilen Phänotyp und der hiermit korrelierende Genlocus (*gst*) einschließlich das für den fertilen/sterilen Phänotyp verantwortliche Gen, das im sterilen Phänotyp mutiert ist. Ferner werden Verfahren zur Identifizierung des Genotyps der mit der oben genannten Merkmalsausprägung korreliert bereitgestellt sowie die entsprechenden genetischen Werkzeugte, wie Hybridisierungssonden und Oligonukleotide. Ferner wird die Verwendung der erfindungsgemäßen Pflanzen in der Hybridzüchtung und in der Herstellung von aus erneuerbaren Rohstoffen stammenden Produkten wie Bioethanol, Biogas und zuckerbasierten Produkten beschrieben.



Beschreibung**GEBIET DER ERFINDUNG**

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft das Gebiet der Vereinfachung von arbeitsaufwendigen Züchtungsprogrammen mittels molekularbiologischer Methoden, Markertechnologie und der Gentechnik. Insbesondere werden Pflanzen zur Verfügung gestellt, die durch spontane Mutation einer Genregion im Kerngenom einen im homozygoten Zustand, kernkodierten männlich sterilen Phänotyp aufweisen, der sich dadurch auszeichnet, dass die Mutation im Gegensatz zu CMS (cytoplasmic male sterility) durch eine rezessive Merkmalsausprägung erhalten wird und somit eine parallele Erhaltung von sterilen und fertilen Genotypen in Züchtungsprogrammen entfällt. Diesbezüglich stellt die vorliegende Erfindung Pflanzen zur Verfügung, insbesondere Zuckerrübe oder Kartoffel, in der mittels Markertechnologie eine Mutation in einem Cytochrom P450 Oxidase (CYPgst) Gen nachgewiesen wurde, die zu der oben genannten Merkmalsausprägung führt sowie das entsprechende Verfahren zur Identifizierung dieser Mutation. Zusätzlich werden ein CYPgst Protein, ein DNA-Molekül enthaltend das mutierte Gen, das zu oben genannter Merkmalsausprägung führt, ein rekombinante DNA-Molekül, das das Wildtypgen, einen Promotor zur spezifischen Expression dieses Gens oder eines heterologen Gens in Blüten und/oder Früchten von Pflanzen und/oder eine Nukleotidsequenz kodierend für Inhibitoren des CYPgst Gens sowie entsprechende Vektoren und Wirtszellen zur Verfügung gestellt.

[0002] Des Weiteren betrifft die vorliegende Erfindung gentechnisch veränderte Pflanzen, die einen rezessiven, kernkodierten männlich sterilen Phänotyp durch Inhibierung der Expression des CYPgst Gens zeigen, die entsprechenden Inhibitoren sowie Verfahren zur Inhibierung des Gens und Verfahren zur Restauration der Fertilität. Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung der Pflanzen in Hybridzüchtungsverfahren, Resistenzzüchtungsverfahren und/oder in der Saatgutproduktion. Ferner sind von der Erfindung auch Samen oder Nachkommen, Organe, Pflanzenteile, Gewebe oder Zellen der erfindungsgemäßen Pflanze sowie deren Verwendung miterfasst.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0003] Zur gesteuerten Erzeugung genetischer Variation werden in Zuckerrüben (*Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*), aber auch in allen anderen Kulturpflanzenarten, Kreuzungen durchgeführt. Dabei werden Pollen tragende Antheren manuell aus noch geschlossenen Blüten des Samenernters entfernt. Die Bestäubung erfolgt dann ebenso manuell durch Aufbringen von Pollen des Pollendonors auf die Narbe des Samenernters. Alternativ kann nach Entfernung der Antheren an Blüten des Samenernters eine Bestäubung auch dadurch erreicht werden, dass der Pollenspender in räumlicher Nähe zum Samenernter zum Blühen und zur Pollenschüttung gebracht wird. In jedem Fall handelt es sich um außerordentlich arbeitsintensive Protokolle, die durchaus fehleranfällig sind, denn z. B. eine ungewollt nur partielle Entfernung der Antheren einer Blüte kann zur Selbstbestäubung führen.

[0004] Die Erzeugung von (kommerziellem) Hybridsaatgut erfolgt gegenwärtig häufig durch Einkreuzung der Samenernter-Komponente in CMS(cytoplasmic male sterility)-tragende Genotypen und anschließende Rückkreuzung, um den genetischen Anteil der Samenernter-Komponente zu erhöhen. Die resultierende männlich sterile Samenernter-Komponente kann im Anschluss großflächig angebaut werden und die Bestäubung erfolgt durch in räumlicher Nähe wachsende Pollenspender (topeross Verfahren). Da CMS dominant maternal vererbt wird, erfordert die Verwendung von CMS-Linien die parallele Bereithaltung von fertilen Maintainer-Linien (also nicht in CMS eingelagerte O-Typen), die die Bestäubung der CMS-Linien sicherstellen. Dies bringt einen hohen Planungs- und Produktionsaufwand sowie eine komplexe Logistik mit sich. Beispielsweise werden kommerzielle Zuckerrüben gegenwärtig als Dreifach-Hybride erzeugt, um Saatgut von ausreichend hoher Qualität zu produzieren. Die Produktion von Hybriden in den Zuchtprogrammen ist ebenfalls kosten- und arbeitsintensiv und wird gegenwärtig durch Aufstellen von Trennwänden verwirklicht.

[0005] In zahlreichen Pflanzenarten gibt es Beschreibungen von Linien bzw. Genotypen, die eine natürlich vorkommende kernkodierte männliche Sterilität ms-(male sterile) zeigen. Verursacht wird diese in der Regel durch spontane Mutation eines Gens im Kerngenom und erhalten wird diese Mutation durch eine rezessive Merkmalsausprägung. Die Verwendung von Genotypen mit kernkodierten männlich sterilen Phänotypen ist geeignet, Teile von Züchtungsprozessen zu vereinfachen und/oder diese für die Erzeugung von Hybridsaatgut einzusetzen. Dabei haben die männlich sterilen Phänotypen den Vorteil, dass sie für Kreuzungen nicht manuell von Antheren befreit werden müssen und eine parallele Erhaltung von fertilen und sterilen Genotypen entfällt, denn durch Selbstbefruchtung spalten sich in jedem Vermehrungsschritt die heterozygoten Genotypen wiederum in fertile und sterile Individuen auf.

[0006] Aufgabe der vorliegenden Erfindung war daher Mittel und Verfahren zur Verwendung der kernkodierten männlichen Sterilität in Nutzpflanzen, insbesondere Zuckerrübe und Kartoffel zur Verfügung zu stellen. Die Aufgabe wird erfindungsgemäß durch die in den Ansprüchen und in der Beschreibung gekennzeichneten Ausführungsformen gelöst.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0007] Die vorliegende Erfindung betrifft das Gebiet der Vereinfachung von arbeitsaufwendigen Züchtungsprogrammen, der Markerttechnologie sowie der Gentechnik. Die Erfindung stellt Pflanzen zur Verfügung, die durch Mutation in einem DNA-Segment umfassend eine Cytochrom P450 Oxidase (CYPgst) einen kernkodierten, rezessiven, männlich sterilen Phänotyp aufweist. Das CYPgst Gen sowie die Mutation wurden mittels Markerttechnologie und molekularbiologischen Methoden identifiziert. Da die Mutation durch die rezessive Merkmalsausprägung erhalten bleibt und durch Selbstbefruchtung in jeden Vermehrungsschritt heterozygote Genotypen wiederum in fertile und sterile Genotypen aufgespalten werden, entfällt die parallele Erhaltung von fertilen Maintainer-Linien. Zusätzlich können die Erkenntnisse dazu genutzt werden, transgene Pflanzen mit einem kernkodierten, rezessiven, männlich sterilen Phänotyp zu generieren und um die Fertilität zu restaurieren.

[0008] Die vorliegende Erfindung betrifft daher die Ausführungsformen, die in den folgenden Punkten [1] bis [36] aufgeführt und in den Beispielen illustriert sind.

[1] Pflanze, insbesondere Nutzpflanze, die einen rezessiven, kernkodierten männlich sterilen Phänotyp zeigt, dadurch gekennzeichnet, dass der Phänotyp mit einer Mutation, welche von dem endogenen Cytochrom P450 Oxidase (CYPgst) Gen umfasst wird, oder mit der Abwesenheit bzw. im Vergleich zu einer entsprechenden (männlich fertilen) Wildtyppflanze geringen Gehalt bzw. Aktivität eines funktionsfähigen CYPgst Proteins, das durch das Wildtypgen von CYPgst kodiert wird, korreliert, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem nicht-mutierten CYPgst Gen a) um das Gen BvCYPgst aus *Beta vulgaris* handelt, das vorzugsweise eine der in SEQ ID Nr.: 1 oder 2 gezeigte Nukleotidsequenz umfasst bzw. die in SEQ ID Nr.: 3 gezeigte Aminosäuresequenz kodiert, oder um dessen Homolog, Analog oder Ortholog, b) um das Gen StCYPgst aus *Solanum tuberosum* handelt, das vorzugsweise eine der in SEQ ID Nr.: 12 oder 13 gezeigte Nukleotidsequenz umfasst bzw. die in SEQ ID Nr.: 14 gezeigte Aminosäuresequenz kodiert, oder um dessen Homolog, Analog oder Ortholog, oder c) um das Gen ZmCYPgst aus *Zea mays* handelt, das vorzugsweise eine der in SEQ ID Nr.: 9 oder 10 gezeigte Nukleotidsequenz umfasst bzw. die in SEQ ID Nr.: 11 gezeigte Aminosäuresequenz kodiert, oder um dessen Homolog, Analog oder Ortholog.

[2] Pflanze nach [1], die heterozygot für die Mutation und männlich fertil oder homozygot für die Mutation und männlich steril ist, wobei in der sterilen Pflanze die Ausbildung von funktionellem Pollen unterbunden, bevorzugt vollständig unterbunden ist.

[3] Pflanze nach [1] oder [2], wobei das CYPgst Gen mindestens in geschlossenen Blüten und Früchten exprimiert wird.

[4] Pflanze nach einem von [1] bis [3], wobei die Mutation die Transkription und/oder Translation eines funktionsfähigen Proteins verhindert, vorzugsweise wobei es sich bei der Mutation um eine Deletion, Addition, Insertion oder Substitution in der kodierenden Nukleotidsequenz des CYPgst Gens, einem Splicing-Signal oder in einer regulatorischen Sequenz, vorzugsweise der Promotorsequenz, des CYPgst Gen handelt. In einer bevorzugten Ausführungsform weist das Nukleinsäuremolekül eine Mutation auf, die auch in der Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID Nr.: 8 im Vergleich mit dem Wildtypgen der SEQ ID Nr.: 1 zu finden ist. Insbesondere kann es sich bei der Mutation um eine Deletion zwischen den Nukleotidpositionen 1560 und 2095 der SEQ ID Nr.: 1 oder entsprechenden Positionen der SEQ ID Nr.: 12 oder 9 handeln. Die Deletion kann eine Länge von mindestens 20, 30 oder 50 konsekutiven Basenpaaren, bevorzugt von mindestens 100, 150, 200 oder 250 konsekutiven Basenpaaren und besonders bevorzugt von mindestens 300, 400 oder 500 konsekutiven Basenpaaren aufweisen. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfasst das Nukleinsäuremolekül eine Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID Nr.: B. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform weist das Nukleinsäuremolekül eine Punktmutation in der Nukleotidsequenz der SEQ ID Nr. 1 gemäß der Tabelle 1 auf, vorzugsweise zwischen den Nukleotidpositionen 1560 und 2095 der SEQ ID Nr.: 1.

[5] Pflanze nach [4], wobei in *Beta vulgaris*, vorzugsweise *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*, die Deletion durch Abwesenheit einer oder beider der Markerloci sle5983d14 (Amplifikationsprodukt der Primer mit SEQ ID Nr.: 4 und 5) und sle5983d17 (Amplifikationsprodukt der Primer mit SEQ ID Nr.: 6 und 7) und durch Anwesenheit eines ubiquitären Markers nachgewiesen werden kann.

[6] Pflanze nach einem von [1] bis [5], wobei in *Beta vulgaris*, vorzugsweise *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*, das Gen in einem Segment auf Chromosom 1 zwischen den Markerloci sxn2151s01 und sle3305s02 lokalisiert ist, wobei die sxn2151s01-Markersequenz dargestellt in SEQ ID Nr. 24 und die sle3305s02-Markersequenz dargestellt in SEQ ID Nr. 26 das Vorhandensein des *gst*-Locus anzeigen und die sxn2151s01-

Markersequenz dargestellt in SEQ ID Nr. 25 und die sle3305s02-Markersequenz dargestellt in SEQ ID Nr. 27 die Referenzsequenz anzeigen.

[7] Pflanze nach [6], wobei das Segment etwa 50 bis 5000 kbp groß ist, vorzugsweise 100 bis 1000 kbp, mehr bevorzugt 100 bis 500 kbp und besonders bevorzugt 200 bis 250 kbp.

[8] Pflanze nach einem von [1] bis [7] wobei es sich bei dem nicht-mutierten Gen um das funktionelle Gen BvCYPgst aus *Beta vulgaris*, vorzugsweise *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* handelt oder ein funktionelles homologes, analoges oder orthologes Gen einer anderen Kultur- und Nutzpflanze.

[9] Pflanze nach [8], wobei es sich bei dem homologen, analogen oder orthologen Gen um ein Gen aus *Zea mays*, das vorzugsweise eine der in SEQ ID Nr.: 9 oder 10 gezeigte Nukleotidsequenz umfasst bzw. die in SEQ ID Nr.: 11 gezeigte Aminosäuresequenz kodiert, aus *Solanum tuberosum*, das vorzugsweise eine der in SEQ ID Nr.: 12 oder 13 gezeigte Nukleotidsequenz umfasst bzw. die in SEQ ID Nr.: 14 gezeigte Aminosäuresequenz kodiert, aus *Triticum aestivum*, das vorzugsweise die in SEQ ID Nr.: 15 gezeigte Aminosäuresequenz kodiert, aus *Helianthus annuus*, das vorzugsweise die in SEQ ID Nr.: 16 gezeigte Aminosäuresequenz kodiert, aus *Hordeum vulgare*, das vorzugsweise die in SEQ ID Nr.: 17 gezeigte Aminosäuresequenz kodiert, aus *Brassica napus*, das vorzugsweise die in SEQ ID Nr.: 18 gezeigte Aminosäuresequenz kodiert, aus *Brassica oleracea*, das vorzugsweise die in SEQ ID Nr.: 19 gezeigte Aminosäuresequenz kodiert, aus *Brassica rapa*, das vorzugsweise die in SEQ ID Nr.: 20 gezeigte Aminosäuresequenz kodiert, aus *Glycine max*, das vorzugsweise die in SEQ ID Nr.: 21 gezeigte Aminosäuresequenz kodiert, aus *Gossypium*, das vorzugsweise die in SEQ ID Nr.: 22 gezeigte Aminosäuresequenz kodiert, aus *Sorghum bicolor*, das vorzugsweise die in SEQ ID Nr.: 23 gezeigte Aminosäuresequenz kodiert, handelt.

[10] Pflanze nach einem von [1] bis [9], wobei das nicht-mutierten Gen (Wildtypgen) eine Nukleotidsequenz aufweist, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus einer:

(a) Nukleotidsequenz, die die in SEQ ID Nr.: 1 oder SEQ ID Nr.: 2 gezeigte Nukleotidsequenz oder ein funktionelles Fragment davon aufweist (siehe bspw. **Abb. 4A** und **Abb. 4B**);

(b) Nukleotidsequenz, die die in SEQ ID Nr.: 3 gezeigte Aminosäuresequenz kodiert;

(c) Nukleotidsequenz, die in der Lage ist, an eine Nukleotidsequenz komplementär zu einer Nukleotidsequenz gemäß (a) oder (b) unter stringenten Bedingungen zu hybridisieren;

(d) Nukleotidsequenz, die eine Aminosäuresequenz kodiert, die gegenüber der Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID Nr.: 3 Abweichungen in Form von Aminosäure-Deletionen, Substitutionen, Additionen und/oder Insertionen in der Aminosäuresequenz und vorzugsweise eine Sequenzidentität von mindestens 60% über die gesamte Aminosäuresequenz aufweist;

(e) Nukleotidsequenz, die ein Protein mit der gleichen enzymatischen Aktivität kodiert, wie das Protein, das durch eine Nukleotidsequenz nach einem aus (a) bis

(d) kodiert wird; und

(f) Nukleotidsequenz, die mindestens 200 oder 400, bevorzugt mindestens 600 oder 800, besonders bevorzugt mindestens 1000 konsekutive Nukleotide aus dem Promotor der Nukleinsäuresequenz von SEQ ID Nr.: 1 von Nukleotidpositionen 1 bis 1518, bevorzugt von Nukleotidpositionen 518 bis 1518, besonders bevorzugt von Nukleotidpositionen 1318–1518 oder eine Sequenz, die an diesen Bereich hybridisiert, umfasst, wobei die Nukleotidsequenz in der Lage ist, die Expression des Gens bzw. eines heterologen Nukleinsäuremoleküls, das operativ mit der Nukleotidsequenz verknüpft ist, spezifisch in geschlossenen Blüten und/oder Früchten zu steuern. Eine Nukleotidsequenz gemäß (c), (d) oder (e) ist beispielsweise eine Nukleotidsequenz, die die in SEQ ID Nr.: 12 oder SEQ ID Nr.: 13 gezeigte Nukleotidsequenz oder ein funktionelles Fragment davon aufweist, oder die die in SEQ ID Nr.: 14 gezeigte Aminosäuresequenz kodiert. Weiterhin ist eine Nukleotidsequenz gemäß (c), (d) oder (e) beispielsweise eine Nukleotidsequenz, die die in SEQ ID Nr.: 9 oder SEQ ID Nr.: 10 gezeigte Nukleotidsequenz oder ein funktionelles Fragment davon aufweist, oder die die in SEQ ID Nr.: 11 gezeigte Aminosäuresequenz kodiert. Ferner ist eine Nukleotidsequenz gemäß (c), (d) oder (e) beispielsweise eine Nukleotidsequenz, die eine Aminosäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID Nr.: 15–23 kodiert.

[11] Pflanze nach einem von [1] bis [10], wobei die Pflanze eine Inzuchtpflanze oder eine Hybridpflanze ist.

[12] Pflanze nach einem von [1] bis [11], die eine Pflanze der Gattung *Zea*, *Solanum*, *Triticum*, *Triticale*, *Helianthus*, *Secale*, *Hordeum*, *Brassica*, *Brachypodium*, *Glycine*, *Gossypium*, *Sorghum*, *Saccharum*, *Setaria*, *Aegilops*, *Oryza*, *Daucus*, *Eucalyptus*, *Erythranthe*, *Genlisea*, *Musa*, *Avena*, *Nicotiana*, *Coffea*, *Vitis*, *Cucumis*, *Morus*, *Crucihimalaya*, *Cardamine*, *Lepidium*, *Capsella*, *Olmarabidopsis*, *Arabis*, *Raphanus*, *Eruca*, *Citrus*, *Jatropha*, *Populus* oder *Beta* ist, vorzugsweise eine Pflanze der Art *Zea mays*, *Solanum tuberosum*, *Triticum aestivum*, *Triticum durum*, *Triticum spelta*, *Helianthus annuus*, *Secale cereale*, *Hordeum vulgare*, *Hordeum bulbosum*, *Brassica napus*, *Brassica oleracea*, *Brassica rapa*, *Brassica juncacea*, *Brassica nigra*, *Glycine max*, *Gossypium* sp., *Sorghum bicolor*, *Triticale*, *Saccharum officinarum*, *Setaria italica*, *Oryza sativa*, *Oryza minuta*, *Oryza australiensis*, *Oryza alta*, *Brachypodium distachyon*, *Hordeum marinum*, *Aegilops tauschii*, *Daucus glochidiatus*, *Daucus pusillus*, *Daucus muricatus*, *Daucus carota*, *Eucalyptus grandis*, *Erythranthe guttata*, *Genlisea aurea*, *Musa* sp., *Avena* sp., *Nicotiana sylvestris*, *Nicotiana tabacum*,

Nicotiana tomentosiformis, *Solanum lycopersicum*, *Coffea canephora*, *Vitis vinifera*, *Cucumis sativus*, *Morus notabilis*, *Crucihimalaya himalaica*, *Crucihimalaya wallichii*, *Cardamine flexuosa*, *Lepidium virginicum*, *Capsella bursa-pastoris*, *Olmarabidopsis pumila*, *Arabis hirsuta*, *Raphanus sativus*, *Eruca vesicaria sativa*, *Citrus sinensis*, *Jatropha curcas*, *Populus trichocarpa* oder *Beta vulgaris*.

[13] Nukleinsäuremolekül oder rekombinantes DNA-Molekül, das eine wie in [10] definierte Nukleotidsequenz umfasst.

[14] Rekombinantes DNA-Molekül nach [13], das (i) einen Promotor mit einer Nukleotidsequenz wie in [10] (f) definiert umfasst, der mit einem heterologen Nukleinsäuremolekül operativ verknüpft ist, oder (ii) eine kodierende Nukleotidsequenz wie in [10] (a)–(e) definiert umfasst, die operativ mit einem heterologen Promoter verknüpft ist, der vorzugsweise in der Lage ist, die Expression der Nukleotidsequenz spezifisch in geschlossenen Blüten und/oder Früchten zu steuern.

[15] Rekombinantes DNA-Molekül umfassend eine Nukleotidsequenz, die eine shRNA (small hairpin RNA), siRNA (small interfering RNA), Antisense-RNA, Sense-RNA oder doppelsträngige RNA kodiert, die nach Expression in einer Pflanzenzelle oder nach Einbringen in eine Pflanzenzelle zur Inhibierung der Expression des funktionellen (nicht-mutierten) CYPgst Gens führt. In einer bevorzugten Ausführungsform weist die Nukleotidsequenz mindestens 15, 16, 17, 18, 19 oder 20, bevorzugt mindestens 21, 22, 23, 24 oder 25, besonders bevorzugt mindestens 30, 35, 40, 45 oder 50, und ganz besonders bevorzugt mindestens 100, 200, 300, 500 oder 1000 konsekutive Nukleotide der SEQ ID Nr.: 1, 2, 9, 10, 12 oder 13 in Sense- oder Antisense-Orientierung oder von mindestens einem Exon der SEQ ID Nr.: 1, 9 oder 12 in Sense- oder Antisense-Orientierung auf. Dabei erstreckt sich das Exon 1 der SEQ ID Nr.: 1 von der Nukleotidposition 1762–2679 und das Exon 2 der SEQ ID Nr.: 1 von der Nukleotidposition 3507–4142. Das Exon 1 der SEQ ID Nr.: 12 erstreckt sich von der Nukleotidposition 1762–2032, das Exon 2 der SEQ ID Nr.: 12 von der Nukleotidposition 2449–3161 und das Exon 3 der SEQ ID Nr.: 12 von der Nukleotidposition 4032–4694. Das Exon 1 der SEQ ID Nr.: 9 erstreckt sich von der Nukleotidposition 2001–2927 und das Exon 2 der SEQ ID Nr.: 9 von der Nukleotidposition 3018–3683. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform weist die Nukleotidsequenz mindestens 15, 16, 17, 18, 19 oder 20, bevorzugt mindestens 21, 22, 23, 24 oder 25, besonders bevorzugt mindestens 30, 35, 40, 45 oder 50, und ganz besonders bevorzugt mindestens 100, 200, 300, 500 oder 1000 konsekutive Nukleotide auf, welche in der Lage sind, spezifisch an eine wie in [10] oder [16] definierte Nukleotidsequenz zu hybridisiert.

[16] Nukleinsäuremolekül, das eine wie in [10] definierte Nukleotidsequenz mit einer Mutation in Form einer Deletion, Addition, Insertion oder Substitution umfasst, wobei diese Mutation dazu führt, dass kein funktionsfähiges CYPgst Protein synthetisiert wird. Vorzugsweise ist die Mutation in der kodierenden Nukleotidsequenz des CYPgst Gens, einem Splicing-Signal oder in einer regulatorischen Sequenz des CYPgst Gens, vorzugsweise in dem Promotor des CYPgst Gen, lokalisiert. In einer bevorzugten Ausführungsform weist das Nukleinsäuremolekül eine Mutation auf, die auch in der Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID Nr.: 8 zu finden ist. Insbesondere kann es sich bei der Mutation um eine Deletion zwischen den Nukleotidpositionen 1560 und 2095 der SEQ ID Nr.: 1 oder entsprechenden Positionen der SEQ ID Nr.: 12 oder 9 handeln. Die Deletion kann eine Länge von mindestens 20, 30 oder 50 konsekutiven Basenpaaren, bevorzugt von mindestens 100, 150, 200 oder 250 konsekutiven Basenpaaren und besonders bevorzugt von mindestens 300, 400 oder 500 konsekutiven Basenpaaren aufweisen. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfasst das Nukleinsäuremolekül eine Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID Nr.: B. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform weist das Nukleinsäuremolekül eine Punktmutation in der Nukleotidsequenz der SEQ ID Nr. 1 gemäß der Tabelle 1 auf, vorzugsweise zwischen den Nukleotidpositionen 1560 und 2095 der SEQ ID Nr.: 1.

[17] Nukleinsäuremolekül von mindestens 15, 16, 17, 18, 19 oder 20, bevorzugt mindestens 21, 22, 23, 24 oder 25, besonders bevorzugt mindestens 30, 35, 40, 45 oder 50, und ganz besonders bevorzugt mindestens 100, 200, 300, 500 oder 1000 konsekutive Nukleotide der SEQ ID Nr.: 1, 2, 9, 10, 12 oder 13 in Sense- und/oder Antisense-Orientierung oder von mindestens einem Exon der SEQ ID Nr.: 1, 9 oder 12 in Sense- oder Antisense-Orientierung. Dabei erstreckt sich das Exon 1 der SEQ ID Nr.: 1 von der Nukleotidposition 1762–2679 und das Exon 2 der SEQ ID Nr.: 1 von der Nukleotidposition 3507–4142. Das Exon 1 der SEQ ID Nr.: 12 erstreckt sich von der Nukleotidposition 1762–2032, das Exon 2 der SEQ ID Nr.: 12 von der Nukleotidposition 2449–3161 und das Exon 3 der SEQ ID Nr.: 12 von der Nukleotidposition 4032–4694. Das Exon 1 der SEQ ID Nr.: 9 erstreckt sich von der Nukleotidposition 2001–2927 und das Exon 2 der SEQ ID Nr.: 9 von der Nukleotidposition 3018–3683. In einer besonderen Ausführungsform erstreckt sich das Nukleinsäuremolekül über mindestens ein Intron der SEQ ID Nr.: 1, der SEQ ID Nr.: 9 oder der SEQ ID Nr.: 12, d. h. das Nukleinsäuremolekül umfasst aufeinanderfolgend i) mindestens ein Nukleotid vom 3'-Ende des Exons 1 der SEQ ID Nr.: 1 (vorzugsweise letztes Nukleotid des Exons 1 der SEQ ID Nr.: 1 in 5'-3'-Richtung; entsprechend Nukleotid an Position 583 der SEQ ID Nr.: 2) und mindestens ein Nukleotid vom 5'-Ende des Exons 2 der SEQ ID Nr.: 1 (vorzugsweise erstes Nukleotid des Exons 2 der SEQ ID Nr.: 1 in 5'-3'-Richtung; entsprechend Nukleotid an Position 584 der SEQ ID Nr.: 2), ii) mindestens ein Nukleotid vom 3'-Ende des

Exons 1 der SEQ ID Nr.: 12 (vorzugsweise letztes Nukleotid des Exons 1 der SEQ ID Nr.: 12 in 5'-3'-Richtung; entsprechend Nukleotid an Position 271 der SEQ ID Nr.: 13) und mindestens ein Nukleotid vom 5'-Ende des Exons 2 der SEQ ID Nr.: 12 (vorzugsweise erstes Nukleotid des Exons 2 der SEQ ID Nr.: 12 in 5'-3'-Richtung; entsprechend Nukleotid an Position 272 der SEQ ID Nr.: 13), iii) mindestens ein Nukleotid vom 3'-Ende des Exons 2 der SEQ ID Nr.: 12 (vorzugsweise letztes Nukleotid des Exons 2 der SEQ ID Nr.: 12 in 5'-3'-Richtung; entsprechend Nukleotid an Position 984 der SEQ ID Nr.: 13) und mindestens ein Nukleotid vom 5'-Ende des Exons 3 der SEQ ID Nr.: 12 (vorzugsweise erstes Nukleotid des Exons 3 der SEQ ID Nr.: 12 in 5'-3'-Richtung; entsprechend Nukleotid an Position 985 der SEQ ID Nr.: 13), oder iv) mindestens ein Nukleotid vom 3'-Ende des Exons 1 der SEQ ID Nr.: 9 (vorzugsweise letztes Nukleotid des Exons 1 der SEQ ID Nr.: 9 in 5'-3'-Richtung; entsprechend Nukleotid an Position 927 der SEQ ID Nr.: 10) und mindestens ein Nukleotid vom 5'-Ende des Exons 2 der SEQ ID Nr.: 9 (vorzugsweise erstes Nukleotid des Exons 2 der SEQ ID Nr.: 9 in 5'-3'-Richtung; entsprechend Nukleotid an Position 928 der SEQ ID Nr.: 10). In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform weist die Nukleotidsequenz mindestens 15, 16, 17, 18, 19 oder 20, bevorzugt mindestens 21, 22, 23, 24 oder 25, besonders bevorzugt mindestens 30, 35, 40, 45 oder 50, und ganz besonders bevorzugt mindestens 100, 200, 300, 500 oder 1000 konsekutive Nukleotide auf, welche in der Lage ist, spezifisch an eine wie in [10] oder [16] definierte Nukleotidsequenz zu hybridisiert.

[18] Oligonukleotid, vorzugsweise mit einer Länge von maximal 50 Nukleotiden, das ein Nukleinsäuremolekül nach [17] oder ein Nukleinsäuremolekül, welches in der Lage ist, spezifisch an eine Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID Nr.: 8 zu hybridisiert, umfasst und/oder vorzugsweise eine der folgenden Nukleotidsequenzen aufweist:

(i) SEQ ID Nr.: 4, 6 oder einem Komplement davon, oder

(ii) SEQ ID Nr.: 5, 7 oder einem Komplement davon.

[19] Vektor, vorzugsweise Pflanzenvektor umfassend ein DNA-Molekül bzw. Nukleinsäuremolekül nach einem von [13] bis [16] oder ein Nukleinsäuremolekül nach [17].

[20] Vektor nach [19], wobei das DNA-Molekül bzw. Nukleinsäuremolekül als Transgen in der Lage ist ein funktionelles CYPgst zu exprimieren und vorzugsweise genetisch gekoppelt ist mit einem weiteren Transgen, welches die Weitergabe des DNA-Moleküls bzw. Nukleinsäuremolekül über den Pollen verhindert, vorzugsweise wobei der Vektor bzw. das Transgen des Weiteren eine Expressionskassette aufweist, die zur einer Markierung der Samen führt, vorzugsweise durch Fluoreszenz-Markierung.

[21] Wirtszelle, vorzugsweise Pflanzenzelle enthaltend ein rekombinantes DNA-Molekül bzw. Nukleinsäuremolekül nach einem von [13] bis [16] oder einen Vektor nach [19] oder [20].

[22] CYPgst Protein, das von einer wie in [10] definierten Nukleotidsequenz kodiert wird oder ein funktionelles und/oder immunologisch aktives Fragment davon. Vorzugsweise handelt es sich bei dem CYPgst Protein um a) die Aminosäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID Nr.: 3, SEQ ID Nr.: 11 und SEQ ID Nrs.: 14–23 oder b) eine Aminosäuresequenz, welche mit der Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID Nr.: 3 zu mindestens 80%, 82%, 84%, 86% oder 88%, bevorzugt zu mindestens 90%, 91%, 92%, 93%, 94% oder 95%, besonders bevorzugt zu mindestens 96%, 97%, 98%, 99% oder 99,5%, vorzugsweise über die Volllänge, identisch ist.

[23] Antikörper, der spezifisch an das CYPgst Protein oder Fragment nach [22] bindet.

[24] Kit umfassend ein DNA-Molekül bzw. Nukleinsäuremolekül nach einem von [13] bis [16], Nukleinsäuremolekül nach [17], Oligonukleotid nach [18], Vektor nach [19] oder [20], CYPgst Protein oder Fragment davon nach [22] und/oder Antikörper nach [23], und gegebenenfalls Reagenzien für nukleinsäurebasierende oder immunologische Nachweisverfahren.

[25] Verfahren zur Herstellung einer Pflanze, insbesondere Nutzpflanze, die einen rezessiven, kernkodierten, im homozygoten Zustand männlich sterilen Phänotyp zeigt, dadurch gekennzeichnet, dass die Expression des CYPgst Gens inhibiert wird.

[26] Verfahren nach [25], dadurch gekennzeichnet, dass das Verfahren einen Schritt des Einbringens des rekombinanten DNA-Moleküls nach [15], des Nukleinsäuremoleküls nach [16] oder [17] oder des Vektors nach [19] oder [20] beispielsweise mittels Agrobacterium-Transformation, T-DNA-Tagging, homologe Rekombination, Mutagenese wie TILLING sowie gezielte Mutagenese z. B. durch Einsatz von Zinkfinger-Nukleasen, von TALE-(Transcription Activator-like Effector)Nukleasen und des CRISPR/Cas Systems umfasst, infolgedessen die Expression des Gens beispielsweise durch RNAi oder Co-Suppression oder aufgrund der eingebrachten Mutation inhibiert wird.

[27] Verfahren zur Restauration der Fertilität einer Pflanze nach einem von [1] bis [12] oder einer Pflanze erhältlich durch ein Verfahren nach [25] oder [26] umfassend das Einbringen eines funktionellen CYPgst Gens in die Pflanze.

[28] Verfahren nach [27], wobei das CYPgst Gen mittels einer rekombinanten DNA nach [13] oder [14] oder eines Vektors, nach [19] oder [20] eingebracht wird oder durch Kreuzung einer Pflanze, die das CYPgst Wildtypgen oder ein funktionellen CYPgst Gen, vorzugsweise im homozygoten Zustand trägt. Optional kann

nach der Kreuzung eine Selektion auf Anwesenheit des CYPgst Wildtypgens oder des funktionellen CYPgst Gens in der Nachkommengeneration erfolgen.

[29] Pflanze enthaltend Pflanzenzellen nach [21] und/oder erhältlich durch ein Verfahren nach einem von [25] bis [28].

[30] Organ, Pflanzenteil, Gewebe oder Zelle der Pflanze nach einem von [1] bis [12] oder [29].

[31] Samen oder Nachkommen der Pflanze nach einem von [1] bis [12] oder [29], wobei der Samen oder die Nachkommen die in einem von [1] bis [12] definierte Mutation aufweist und/oder ein rekombinantes DNA-Molekül bzw. Nukleinsäuremolekül nach einem von [13] bis [16] oder einen Vektor nach [19] oder [20].

[32] Verfahren zur Identifizierung einer Pflanze nach einem von [1] bis [12] oder [29] durch Nachweis einer Mutation in dem CYPgst Gen bzw. eines Markers, der mit der Mutation gekoppelt ist.

[33] Verwendung eines DNA-Moleküls bzw. Nukleinsäuremolekül nach einem von [13] bis [16], Nukleinsäuremoleküls nach [17], Oligonukleotids nach [18], Vektors nach [19] oder [20], CYPgst Proteins oder Fragment davon nach [22], Antikörpers nach [23], und/oder Kits nach [24] zur Identifizierung einer Pflanze nach einem von [1] bis [12] oder [29], in der Herstellung einer rezessiven, kernkodierten, männlich sterilen Pflanze, in der Herstellung einer Pflanze mit restaurierter Fertilität, in der Herstellung einer Hybridpflanze, in Resistenzzuchtprogrammen, oder zur Saatgutproduktion.

[34] Verwendung des DNA-Moleküls nach [14] bzw. des in [14] definierten Promotors zur spezifischen Expression von heterologen Nukleinsäuremolekülen in Blüten und/oder Früchten von Pflanzen.

[35] Verwendung einer Pflanze nach einem von [1] bis [12] oder [29], Organ, Pflanzenteil, Gewebe oder Zelle nach [30], Samen oder Nachkommen nach [31] oder einer durch das Verfahren nach [32] identifizierten oder durch Verwendung nach [33] oder [34] erhältlichen Pflanze oder deren Gewebe, Zelle, Nachkommen oder Samen in der Herstellung von Nahrungsmitteln, Werkstoffen, Arzneimitteln bzw. Vorstufen davon, Diagnostika, Kosmetika, Feinchemikalien, Zucker, Sirup, Bioethanol oder Biogas.

[36] Nahrungsmittel, Futtermittel oder Werkstoff enthaltend eine Pflanze nach einem von [1] bis [12] oder [29], Organ, Pflanzenteil, Gewebe oder Zelle nach [30], Samen oder Nachkommen nach [31] oder eine durch das Verfahren nach [32] identifizierten oder durch Verwendung nach [33] oder [34] erhältlichen Pflanze oder deren Gewebe, Zelle, Nachkommen oder Samen.

[37] Verwendung einer Pflanze nach einem von [1] bis [12] oder [29] zur Züchtung oder der Herstellung einer Nachkommenpflanze, wobei der kernkodierte männlich sterile Phänotyp zur rekurrenten Selektion genutzt wird.

[0009] Zunächst werden einige der in dieser Anmeldung verwendeten Begriffe nachfolgend näher erläutert: Der Ausdruck "Chromosomensegment", sowie Variationen der Begriffe wie "chromosomales Segment" oder "Segment auf Chromosom" werden wenn nicht anders angegeben äquivalent verwendet und bezeichnen einen spezifischen chromosomalen DNA-Abschnitt eines bestimmten Chromosoms, der mindestens ein Gen umfasst.

[0010] Das "CYPgst Gen" bzw. das "Wildtyp Gen von CYPgst" kodiert für das "CYPgst Protein", welches eine Rolle in der Ausbildung vitaler Pollen spielt, denn eine Mutation in CYPgst führt zu männlich sterilen Pflanzen durch Unterbindung der Ausbildung von funktionellem Pollen. Experimentell wurde dies in der Zuckerrübe (*Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*) nachgewiesen. Durch Homologie Vergleiche konnte eine Ähnlichkeit zu dem CYP 703 Gen aus *Arabidopsis thaliana* festgestellt werden, welches nach aktuellem Stand der Technik (Morant et al., *The Plant Cell*, 19 (2007), 1473–1487) in der Synthese des Sporopollenins (Hauptbestandteil vitaler Pollen) eine essentielle Funktion erfüllt und vorzugsweise die Umwandlung von mittelkettigen gesättigten Fettsäuren in die entsprechenden einfachhydroxylierten Fettsäuren katalysiert, mit einer bevorzugten Hydroxylierung von Laurinsäure an der C-7 Position. Die Ausschaltung des CYP703 Gens in *Arabidopsis thaliana* führte zu einer partiellen männlichen Sterilität. Die Menge an Pollen war zwar reduziert aber es konnte funktionsfähiger Pollen gebildet werden. Daher scheint das Gen aus *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* eine andere Funktion zu übernehmen, denn eine Ausschaltung führt hier zu einer männlichen Sterilität der Pflanze. Ohne an eine Theorie gebunden zu sein erscheint es plausibel, dass das CYPgst Gen einer anderen Klasse der CYP Gene zuzuordnen ist bzw. in Kulturpflanzen, insbesondere Nutzpflanzen wie Zuckerrübe eine andere Funktion oder Bedeutung hat als in der niedrigen Modellpflanze *Arabidopsis thaliana*; siehe auch die Diskussion in Beispiel 1. Der Fachmann kann weitere CYPgst Proteine Datenbanken unter Verwendung geeigneter Suchprofile und Computerprogramme für das Screening nach homologen Sequenzen bzw. für Sequenzvergleiche entnehmen. Eine mögliche Überprüfung, ob die identifizierten Gene die gleiche Funktion wie das CYPgst Gen in *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* erfüllen, kann durch eine Wiederherstellung der Funktion von CYPgst in einer männlich sterilen Zuckerrübenpflanze durch heterologe Expression der identifizierten Gene überprüft werden, d. h. durch Restauration der Fertilität durch das Transgen.

[0011] Ohne an eine bestimmte Theorie gebunden zu sein, ist es allerdings auch nicht auszuschließen, dass das CYPgst Gen aus *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* und das CYP703 Gen aus *Arabidopsis thaliana* der gleichen CYP-Familie angehören und somit die gleiche oder zumindest eine ähnliche Funktion in der Synthese des Sporopollenins erfüllen, dass jedoch in Kulturpflanzen, die durch jahrelange gezielte Selektion und Kreuzungen hinsichtlich u. a. Ertrag, Schädlingsresistenz, Toleranz gegen abiotische Stressfaktoren, sowie Gehalts pflanzlicher Inhaltsstoffe optimiert wurden, die Fähigkeit zur Kompensation des fehlenden Sporopollenins abhandengekommen ist, und dass somit die Abwesenheit von Sporopollenin dazu führt, dass die Ausbildung von Pollen unterbunden wird und die Pflanze somit männlich steril ist.

[0012] Der Begriff "gst-Locus" bezeichnet erfindungsgemäß eine genomische DNA-Region in einer Pflanze, insbesondere Nutzpflanze, in der eine Mutation mit einer rezessiv vererbten, kernkodierten männliche Sterilität korreliert, wobei die Mutation das Cytochrom P450 Oxidase (CYPgst) Gen umfasst und dazu führt, dass in einer betroffenen, die Mutation im gst-Locus enthaltenen und insbesondere für die Mutation homozygoten Pflanze der Gehalt bzw. die Aktivität eines funktionellen CYPgst Proteins im Vergleich zu einer entsprechenden (männlich fertilen), den Wildtyp-Locus enthaltenen Pflanze (Wildtyppflanze) geringer ist oder vollständig abwesend. Typischerweise wird durch die Mutation im CYPgst Gen, die Transkription und/oder Translation eines funktionsfähigen CYPgst Proteins verhindert.

[0013] Unter dem Begriffe "eng-flankierend" wird verstanden, dass zwei Loci (beispielsweise zwei Marker (Markerloci)) auf einer Genkarte weniger als 15 cM, weniger als 12 cM, weniger als 10 cM, weniger als 8 cM, weniger als 7 cM, weniger als 6 cM, weniger als 5 cM, weniger als 4 cM, weniger als 3 cM, weniger als 2 cM, weniger als 1 cM, weniger als 0,5 cM, weniger als 0,2 cM, weniger als 0,1 cM, weniger als 0,05 cM entfernt voneinander sind.

[0014] Unter "Hybridisieren" oder "Hybridisierung" wird ein Vorgang verstanden, bei dem sich ein einzelsträngiges Nukleinsäuremolekül an einen weitestgehend komplementären Nukleinsäurestrang anlagert, d. h. Basenpaarungen mit diesem eingeht. Standardverfahren zur Hybridisierung sind beispielsweise in Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001 beschrieben. Vorzugsweise wird darunter verstanden, dass mindestens 60%, weiter bevorzugt mindestens 65%, 70%, 75%, 80% oder 85%, besonders bevorzugt 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% der Basen des Nukleinsäuremoleküls eine Basenpaarung mit dem weitestgehend komplementären Nukleinsäurestrang eingehen. Die Möglichkeit einer solchen Anlagerung hängt von der Stringenz der Hybridisierungsbedingungen ab. Der Begriff "Stringenz" bezieht sich auf die Hybridisierungsbedingungen. Hohe Stringenz ist dann gegeben, wenn eine Basenpaarung erschwert ist, niedrige Stringenz, wenn eine Basenpaarung erleichtert ist. Die Stringenz der Hybridisierungsbedingungen hängt beispielsweise von der Salzkonzentration bzw. Ionenstärke und der Temperatur ab. Generell kann die Stringenz durch eine Erhöhung der Temperatur und/oder eine Erniedrigung des Salzgehaltes erhöht werden. Unter "stringenten Hybridisierungsbedingungen" sind solche Bedingungen zu verstehen, bei denen eine Hybridisierung überwiegend nur zwischen homologen Nukleinsäuremolekülen und Homologen stattfindet. Der Begriff "Hybridisierungsbedingungen" bezieht sich dabei nicht nur auf die bei der eigentlichen Anlagerung der Nukleinsäuren herrschenden Bedingungen, sondern auch auf die bei den anschließenden Waschschrritten herrschenden Bedingungen. Stringente Hybridisierungsbedingungen sind beispielsweise Bedingungen, unter denen überwiegend nur solche Nukleinsäuremoleküle hybridisieren, die mindestens 70%, vorzugsweise mindestens 75%, mindestens 80%, mindestens 85%, mindestens 90% oder mindestens 95% Sequenzidentität aufweisen. Stringente Hybridisierungsbedingungen sind beispielsweise: Hybridisieren in $4 \times \text{SSC}$ bei 65°C und anschließendes mehrfaches Waschen in $0,1 \times \text{SSC}$ bei 65°C für insgesamt etwa 1 Stunde. Der hier verwendete Begriff "stringente Hybridisierungsbedingungen" kann auch bedeuten: Hybridisieren bei 68°C in $0,25 \text{ M}$ Natriumphosphat, pH 7,2, 7% SDS, 1 mM EDTA und 1% BSA für 16 Stunden und anschließendes zweimaliges Waschen mit $2 \times \text{SSC}$ und 0,1% SDS bei 68°C . Bevorzugt findet eine Hybridisierung unter stringenten Bedingungen statt.

[0015] "Komplementäre" Nukleotidsequenz bedeutet bezogen auf eine Nukleinsäure in Form einer doppelsträngigen DNA, dass der zum ersten DNA Strang komplementäre zweite DNA Strang entsprechend den Basenpaarungsregeln die Nukleotide aufweist, die zu den Basen des ersten Stranges korrespondieren.

[0016] Der Begriff "(molekularer) Marker" ist eine Nukleotidsequenz, die als Bezugs- oder Orientierungspunkt verwendet wird. Ein Marker zum Erkennen eines Rekombinationsereignisses sollte geeignet sein, Unterschiede oder Polymorphismen innerhalb einer pflanzlichen Population zu überwachen. Für Marker finden sich diese Unterschiede auf DNA-Ebene und sind beispielsweise Polynukleotidsequenzunterschiede wie zum Beispiel SSRs (simple sequence repeats), RFLPs (restriction fragment length polymorphisms), FLPs (fragment length polymorphisms) oder SNPs (single nucleotide polymorphisms). Die Marker können von genomischen oder

tung jedoch nicht beschränkt. Unter pflanzlichen "Zellen" sind beispielsweise isolierte Zellen mit einer Zellwand oder Aggregate davon oder Protoplasten zu verstehen.

[0022] Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung betrifft der Begriff "regulatorische Sequenz" eine Nukleotidsequenz, welche die Spezifität und/oder die Expressionsstärke beeinflusst, zum Beispiel indem die regulatorische Sequenz eine bestimmte Gewebespezifität vermittelt. Eine solche regulatorische Sequenz kann stromaufwärts des Transkriptionsinitiationspunkts eines Minimalpromotors, aber auch stromabwärts davon wie beispielsweise in einer transkribierten aber nicht translatierten Leader-Sequenz oder innerhalb eines Introns lokalisiert sein.

[0023] Ein "Promotor" ist ein nicht-translatierter DNA-Abschnitt, typischerweise stromaufwärts einer kodierenden Region, welche die Bindestelle für die RNA-Polymerase beinhaltet und die Transkription der DNA initiiert. Ein Promotor enthält zudem andere Elemente, die als Regulatoren der Genexpression fungieren (z. B. cis-regulatorischen Elemente). Ein "Kern- oder Minimalpromotor" ist ein Promoter, der zumindest die Grundelemente, welche für die Transkriptionsinitiation gebraucht werden, aufweist (z. B. TATA-Box und/oder Initiator).

[0024] Eine "Transgene Pflanze" bezieht sich auf eine Pflanze, in deren Genom mindestens ein Polynukleotid, vorzugsweise ein heterologes Polynukleotid, integriert ist. Bevorzugt ist das Polynukleotid stabil integriert, was bedeutet, dass das integrierte Polynukleotid in der Pflanze stabil erhalten bleibt, exprimiert wird und auch stabil an die Nachkommen vererbt werden kann. Das stabile Einbringen eines Polynukleotids in das Genom einer Pflanze schließt auch die Integration in das Genom einer Pflanze der vorhergehenden Parentalgeneration mit ein, wobei das Polynukleotid stabil weitervererbt werden kann. Der Begriff "heterolog" bedeutet, dass das eingebrachte Polynukleotid beispielsweise von einer Zelle oder einem Organismus mit einem anderen genetischen Hintergrund derselben Spezies oder einer anderen Spezies stammt, oder homolog ist zu der prokaryotischen oder eukaryotischen Wirtszelle, dann aber in einer unterschiedlichen genetischen Umgebung lokalisiert ist und sich so von einem eventuell natürlicherweise vorhandenen korrespondierenden Polynukleotid unterscheidet. Ein heterologes Polynukleotid kann zusätzlich zu einem entsprechenden endogenen Gen vorhanden sein. Ausgestaltungen und Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung werden in exemplarischer Weise mit Bezug auf die angehängten Abbildungen und Sequenzen beschrieben:

[0025] Abb. 1: A, C) Blüten von fertilen Zuckerrüben (*Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*) und B, D) Blüten von männlich sterilen Zuckerrüben, deren Phänotyp auf den Donor C311 [2043_K5] zurückgeht. A, B) Geschlossene Blüten, deren Sepalen und Petalen manuell entfernt wurden. Deutlich zu sehen sind die hellen (gelben), vitalen Antheren des fertilen Genotyps (A). Im Gegensatz dazu sind die Antheren der sterilen Genotypen deutlich dunkel (braun) verfärbt. Während der Blütenreife öffnen sich die Antheren fertiler Genotypen und entlassen Pollen (C), während die Antheren steriler Genotypen nicht weiter reifen und keinen Pollen enthalten.

[0026] Abb. 2: In RefBeet 1.2 annotiertes Genmodell von BvCYPgst (g6845.t1) im Referenzgenotyp KWS 2320. Das Protein mit einer Länge von 517 Aminosäuren wird von zwei Exons mit einer Gesamtlänge von 1554 bp kodiert. Genotypen, die einen männlich sterilen Phänotyp ausprägen zeigen eine Deletion von 533 bp, die Teile der 5'UTR und des ersten Exons des Gens umfasst. Eine korrekte Transkription der mRNA und Translation eines funktionsfähigen Proteins ist damit ausgeschlossen.

[0027] Abb. 3: Alignment eines 4721 bp genomischen DNA Fragments, das das Zuckerrüben-Genmodell von BvCYPgst (g6845.t1) kodiert, von sterilen und fertilen Genotypen. Die Sequenz der sterilen Genotypen weist eine 533 bp Deletion auf.

[0028] Abb. 4: Sequenzanalyse des 4721 bp genomischen DNA Fragments, das das Zuckerrüben-Gen BvCYPgst (g6845.t1) kodiert, von sterilen und fertilen Genotypen. A) Dargestellt ist die genomische DNA-Sequenz des CYPgst Gens aus *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* inklusive der putativen Promotorregion sowie der 5'UTR und 3'UTR. Die putative Promotorregion ist in "fett" dargestellt, die 5'UTR sowie die 3'UTR sind unterstrichen, Exon 1 ist "fett" und unterstrichen, Exon 2 ist "kursiv" und unterstrichen und das Intron ist in "kursiv" dargestellt. Diese Sequenz entspricht der in SEQ ID Nr. 1 hinterlegten Sequenz. Die funktionellen Bereiche des Gens sind wie folgt lokalisiert: Putativer Promotor 1..1518; 5'UTR 1519..1761; transkribierter Bereich 1519..4275; Exon 1762..2679; Intron 2680..3506; Exon 3507..4142; 3'UTR 4143..4275. B) Dargestellt ist die cDNA-Sequenz des CYPgst Gens aus *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* inklusive der 5'UTR und 3'UTR. Die 5'UTR sowie die 3'UTR sind unterstrichen, Exon 1 ist "fett" und unterstrichen und Exon 2 ist "kursiv" und unterstrichen dargestellt. Diese Sequenz entspricht der in SEQ ID Nr. 2 hinterlegten Sequenz. Die funktionellen Bereiche der cDNA sind wie folgt lokalisiert: 5'UTR 1..243; Exon 244..1161; Exon 1162..1797; 3'UTR 1798..1930. C) Dargestellt ist die Aminosäuresequenz des CYPgst Gens aus *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*. Diese Sequenz entspricht der in

SEQ ID Nr. 3 hinterlegten Sequenz. D) Dargestellt ist die genomischen DNA-Sequenz des mutierten CYPgst Gens aus *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* inklusive der putativen Promotorregion sowie der 3'UTR. Die putative Promotorregion ist in „fett“ dargestellt, die 3'UTR ist unterstrichen, das verkürzte Exon 1 ist „fett“ und unterstrichen, Exon 2 ist „kursiv“ und unterstrichen und das Intron ist in „kursiv“ dargestellt. Diese Sequenz entspricht der in SEQ ID Nr. 8 hinterlegten Sequenz. Die funktionellen Bereiche des mutierten CYPgst Gens sind wie folgt lokalisiert: Putative Promoter 1..1353; transkribierter Bereich 1354..3542; trunkiertes Exon 1354..1938; Intron 1939..2755; Exon 2756..3394; 3'UTR 3395..3542.

[0029] Abb. 5: Expressionsanalyse des Gens BvCYPgst (GST, g6845.t1) mittels qRT-PCR. RNA wurde aus verschiedenen Geweben von fertilen Pflanzen gewonnen und die Expression des GST-Gens im Vergleich zur Expression des Gens g4645.t1 dargestellt. n. d., keine Expression nachweisbar. GST wird im gezeigten Experiment in geschlossenen Blüten am stärksten exprimiert. Als Vergleich ist in geschlossenen Blüten der sterilen Gentyphen keine Expression des GST nachweisbar.

AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0030] Die vorliegende Erfindung stellt eine Pflanze zur Verfügung, die durch Mutation in einem DNA-Segment des Kerngenoms, das ein Cytochrom P450 Oxidase (CYPgst) Gen umfasst, einen kernkodierten männlich sterilen Phänotyp aufweist. Dieser ist dadurch ausgezeichnet, dass die Mutation durch eine rezessive Merkmalsausprägung erhalten wird und die Pflanze somit zur Vereinfachung von arbeitsaufwendigen Züchtungsprogrammen eingesetzt werden kann. Die Identifizierung des für diese Merkmalsausprägung verantwortlichen Gens erfolgte in der Zuckerrübe (*Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*) wie in den Beispielen 1 und 2 nebst **Abb. 1 bis Abb. 5** beschrieben. Das betreffende Gen wurde aufgrund seiner durch Sequenzanalyse bestimmten strukturellen Merkmale als ein Mitglied der Cytochrom P450 Oxidasen (CYP) klassifiziert und aufgrund des für seine Mutante beobachteten Phänotyp der kerngenetischen männlichen Sterilität mit dem Suffix „gst“ versehen. Da das Gen in Zuckerrübe identifiziert wurde, wird ferner das Präfix „Bv“ verwendet wenn konkret auf das in den Beispielen beschriebene Gen Bezug genommen wird.

[0031] Im Allgemeinen betrifft die vorliegende Erfindung eine Pflanze, insbesondere Kultur- bzw. Nutzpflanze, die einen rezessiven, kernkodierten männlich sterilen Phänotyp zeigt, dadurch gekennzeichnet, dass der Phänotyp mit einer Mutation, welche von dem endogenen Cytochrom P450 Oxidase (CYPgst) Gen umfasst wird, oder mit der Abwesenheit bzw. im Vergleich zu einer entsprechenden (männlich fertilen) Wildtyppflanze geringen Gehalt bzw. Aktivität eines funktionsfähigen CYPgst Proteins, das durch das Wildtypgen von CYPgst kodiert wird, korreliert, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem nicht-mutierten CYPgst Gen um das Gen BvCYPgst aus *Beta vulgaris* handelt, das eine der in SEQ ID Nr.: 1 oder 2 gezeigte Nukleotidsequenz umfasst bzw. die in SEQ ID Nr.: 3 gezeigte Aminosäuresequenz kodiert, oder um dessen Homolog, Analog, oder Ortholog. Wie vorstehend beschrieben und in den Beispielen erläutert können durch klassische bioinformatische Ansätze (Datenbankrecherche und Computerprogramme für das Screening nach homologen Sequenzen) weitere CYPgst Proteine bzw. deren kodierende Gene, d. h. Homologe, Analoge und Orthologe in Pflanzen identifiziert werden, wobei davon auszugehen ist, dass eine Mutation den gleichen Phänotyp hervorrufen wird, wie in der Zuckerrübe beobachtet. Somit ist eine Pflanze der vorliegenden Erfindung auch dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem nicht-mutierten CYPgst Gen um das Gen StCYPgst aus *Solanum tuberosum* handelt, das vorzugsweise eine der in SEQ ID Nr.: 12 oder 13 gezeigte Nukleotidsequenz umfasst bzw. die in SEQ ID Nr.: 14 gezeigte Aminosäuresequenz kodiert, oder um dessen Homolog, Analog oder Ortholog; oder dass es sich bei dem nicht-mutierten CYPgst Gen um das Gen ZmCYPgst aus *Zea mays* handelt, das vorzugsweise eine der in SEQ ID Nr.: 9 oder 10 gezeigte Nukleotidsequenz umfasst bzw. die in SEQ ID Nr.: 11 gezeigte Aminosäuresequenz kodiert, oder um dessen Homolog, Analog oder Ortholog.

[0032] Der Begriff Homolog(e) bedeutet dabei, dass die betreffenden Gene (aus zwei verschiedenen Pflanzenarten) im Wesentlichen die gleichen Funktion und einen gemeinsamen Vorläufer haben, und sich daher typischerweise eine signifikante Identität in deren Nukleinsäure- bzw. kodierten Aminosäuresequenz zeigt. Es gibt aber auch viele Gene, die zueinander homolog sind, ohne dass Protein-Sequenzen ein sinnvolles paarweises Alignment ergeben. Im Gegensatz dazu beschreibt der Begriff Analog(e) Gene bzw. Proteine, die (ebenfalls) eine identische oder ähnliche Funktion haben, aber nicht aus derselben Struktur entstanden sind, d. h. keine gemeinsamen Vorläufer haben. In diesem Fall lässt sich oftmals keine signifikante Identität in deren Nukleinsäure- bzw. kodierten Aminosäuresequenz feststellen oder bestenfalls in bestimmten funktionellen Domänen.

[0033] Homologe werden im Kontext der Genom-Sequenzierung zur Annotation feiner klassifiziert. Dazu wurden die Begriffe Orthologie und Paralogie eingeführt. Orthologe sind Gene, die über ein Speziationereignis verbunden sind. Paraloge sind Gene, die über ein Duplikationereignis verbunden sind. Ein Gen ist grundsätzlich

dann ein Homolog bzw. Analog oder Ortholog im Sinne der vorliegenden Erfindung wenn es in der Lage ist, den männlich sterilen Phänotyp wie er bei dem Referenzgen CYPgst in Zuckerrübe (BvCYPgst) zu komplementieren und/oder eine zielgerichtete Mutation in dem betreffenden Gen bzw. Veränderungen der biologischen Aktivität des durch das Homolog oder Analog kodierten Genprodukts ein männlich steriler Phänotyp in der Pflanze, aus der das Gen stammt hervorgerufen wird. Dementsprechend kann das betreffende Homolog bzw. Analog zum in den Beispielen illustrierten CYPgst Gen der vorliegenden Erfindung vorzugsweise dadurch gekennzeichnet werden, dass es in der Lage ist den männlich sterilen Phänotyp, der für die CYPgst Mutante der Zuckerrübe beobachtet wird zu komplementieren, d. h. den fertilen Phänotyp zu restaurieren. Zusätzlich oder alternativ kann das CYPgst Homolog bzw. Analog vorzugsweise dadurch gekennzeichnet werden, dass durch eine Inhibierung dessen Expression oder der biologischen Aktivität des durch das Homolog oder Analog kodierten Genprodukts ein männlich steriler Phänotyp hervorgerufen wird. Vorzugsweise weist der männlich sterile Phänotyp die beispielhaft für die CYPgst Mutante aus Zuckerrübe, insbesondere in den Beispielen beschriebenen Eigenschaften auf; siehe auch die vorstehend beschriebenen Ausführungsformen.

[0034] Entsprechende Techniken und Verfahren zu Komplementationsgenetik sind dem Fachmann aus dem Stand der Technik bekannt; siehe beispielsweise Napoli et al., *Plant Physiology* 120 (1999), 615–622, die eine Mutation in einer Inzuchtlinie von Petunie beschreibt, die unter anderem ein männlich sterilen Phänotyp aufweist, der durch transgene Komplementation mit einer funktionellen Chalcon Synthase A cDNA aufgehoben wurde und somit festgestellt werden konnte, dass das Chalcon Synthase Gen A wesentlich für den männlich sterilen Phänotyp ist bzw. der Phänotyp der männlichen Sterilität durch eine Mutation in diesem Gen hervorgerufen wurde. In Jeong et al., *J. Exp. Bot.* 65 (2014), 6693–6709, wurde durch Komplementation und mittels transgener Expression verschiedener Kandidatengene die männliche Sterilität in der sogenannten ms10³⁵ Mutante von Tomate komplementiert und aufgehoben. Verfahren zur Herstellung männlicher Sterilität in transgenen Pflanzen durch Inhibierung eines Zielgens, in diesem Fall CYPgst sind dem Fachmann ebenfalls bekannt; siehe beispielsweise die internationale Anmeldung WO 1996/017945 sowie die nachstehend beschriebenen Ausführungsformen. Somit ist in einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung eine Pflanze, die einen rezessiven, kernkodierten, männlich sterilen Phänotyp zeigt, dadurch gekennzeichnet, dass der Phänotyp durch eine Mutation, welche von dem endogenen Cytochrom P450 Oxidase (CYPgst) Gen umfasst wird, hervorgerufen wird. Die erfindungsgemäße Pflanze kann aber auch durch die Abwesenheit bzw. im Vergleich zu einer entsprechenden männlich fertilen Wildtyppflanze geringen Gehalt bzw. Aktivität eines funktionsfähigen CYPgst Proteins, das durch das Wildtypgen von CYPgst kodiert wird, gekennzeichnet sein. Eine genomische Sequenz des mutierten Gens, welches nicht mehr translatiert werden kann, ist in SEQ ID Nr. 8 aufgeführt, soll aber nur als Beispiel dienen und die Erfindung diesbezüglich nicht einschränken. Insbesondere betrifft die Erfindung eine Pflanze, die einer Kultur- und Nutzpflanze zuzuordnen ist.

[0035] Im Stand der Technik (Morant et al., *The Plant Cell*, 19 (2007), 1473–1487) ist beschrieben, dass eine Ausschaltung des CYP703 Gens in *Arabidopsis thaliana* (CYP703A2) zu einer reduzierten Pollenbildung und somit zu einer partiellen männlichen Sterilität führt. Dies ist darauf zurückzuführen, dass das Sporopollenin, als Hauptbestandteil der Exin-Schicht von Pollen, abwesend oder strukturell verändert war. Obwohl es plausibel klingt, dass das CYPgst Gen eine andere Funktion übernimmt, da eine Mutation zu einer kernkodierten, rezessiven, männlichen Sterilität führt und es nicht zu einer Ausbildung von Pollen kommt, soll nicht ausgeschlossen werden, dass das CYPgst Gen und das CYP703 Gen aus *Arabidopsis thaliana* zur gleichen Genfamilie gehören und somit die gleiche oder zumindest ähnliche Funktion in der Synthese des Sporopollenins erfüllen. Ohne an eine bestimmte Theorie gebunden zu sein, klingt es jedoch plausibel, dass in Kulturpflanzen, die durch jahrelange gezielte Selektion und Kreuzungen hinsichtlich u. a. Ertrag, Schädlingsresistenz, Toleranz gegen abiotische Stressfaktoren, sowie Gehalts pflanzlicher Inhaltsstoffe optimiert wurden, die Fähigkeit zur Kompensation des fehlenden Sporopollenins abhandengekommen ist und dass somit die Abwesenheit von Sporopollenin dazu führt, dass die Ausbildung von Pollen unterbunden wird und die Pflanze somit männlich steril ist.

[0036] Da in Morant et al. (2007) beschrieben ist, dass das CYP703A2 Gen bzw. entsprechende Knockout Linien von *Arabidopsis* lediglich ein partiell männlich sterilen Phänotyp aufweisen, und sich ein solcher Phänotyp nicht für die Hybridzüchtung eignet, ist in einer Ausführungsform das CYP703A2 Gen aus *Arabidopsis thaliana* bzw. die in Morant et al. beschriebene Mutanten, insbesondere mit den in **Fig. 1** gezeigten Sequenzen von der vorliegenden Erfindung ausgenommen. Dementsprechend ist in einer bevorzugten Ausführungsform die Pflanze der vorliegenden Erfindung eine Kultur- und/oder Nutzpflanze von der *Arabidopsis thaliana* vorzugsweise ausgenommen ist.

[0037] Pflanzen besitzen als Eukaryoten zwei oder mehr Kopien ihrer genetischen Information pro Zelle. Jedes Gen wird in der Regel durch zwei Allele, die im homozygoten Zustand identisch bzw. im heterozygoten

Zustand unterschiedlich sein können, repräsentiert. Der Phänotyp der erfindungsgemäßen Pflanze wird durch eine Mutation im Kerngenom verursacht und erhalten wird diese durch eine rezessive Merkmalsaufprägung. Dementsprechend ist in einer Ausführungsform der Erfindung die Pflanze männlich fertil wenn die Mutation heterozygot vorliegt und männlich steril wenn die Mutation homozygot vorliegt.

[0038] In einer sterilen Pflanze ist die Ausbildung von funktionellem Pollen unterbunden, bevorzugt vollständig unterbunden, wobei im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung der Begriff "unterbunden" bedeutet, dass in einer Pflanze, die homozygot für die Mutation im CYPgst Locus und männlich steril ist, die Ausbildung des Pollens zu 95%, vorzugsweise 96%, mehr bevorzugt 97%, besonders bevorzugt 98%, und insbesondere bevorzugt zu 99% nicht stattfindet, während "vollständig unterbunden" meint, dass die Ausbildung des Pollens zu mehr als 99%, vorzugsweise zu 100% unterbunden ist. Vorzugsweise bedeutet in diesem Zusammenhang "unterbunden", dass bei dem Versuch der Kreuzung einer solchen Pflanze als männlicher Elter mit einer entsprechenden Wildtyp-Pflanze im Wesentlichen keine Saatproduktion erfolgt und/oder keine Nachkommen erzeugt werden.

[0039] Im Fall von *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* wird dies anhand **Abb. 1** deutlich. In geschlossenen Blüten, deren Sepalen und Petalen manuell entfernt wurden, erkennt man die hellen (gelben), vitalen Antheren des fertilen Genotyps (A). Im Gegensatz dazu sind die Antheren der sterilen Genotypen deutlich dunkel (braun) verfärbt (B). Während der Blütereifung öffnen sich die Antheren der fertilen Genotypen und entlassen Pollen (C), während die Antheren steriler Genotypen nicht weiter reifen und keinen Pollen entlassen (D).

[0040] In *Arabidopsis thaliana* katalysiert das CYP703 Protein die Umwandlung von mittelkettigen gesättigten Fettsäuren in die entsprechenden einfach-hydroxylierten Fettsäuren, mit einer bevorzugten Hydroxylierung von Laurinsäure an der C7 Position. Ohne an eine bestimmte Theorie gebunden zu sein, klingt es plausibel, dass das CYPgst Protein zwar nicht die gleichen, aber eine ähnliche Funktion erfüllt wie das CYP703 Protein aus *Arabidopsis thaliana*, da eine Ausschaltung beider Gene Einfluss auf die Ausbildung von Pollen hat. Somit kann CYPgst eine Funktion in der Synthese des Sporopollenins, dem Hauptbestandteil der Exin-Schicht vitaler Pollen zugeschrieben werden.

[0041] In einer Ausführungsform weist daher das CYPgst Protein eine Funktion in der Synthese des Sporopollenins auf und katalysiert die Umwandlung mittelkettiger gesättigter Fettsäuren in die entsprechenden einfach-hydroxylierten Fettsäuren, bevorzugt die Hydroxylierung von Laurinsäure an der C7 Position.

[0042] Anhand von Transkriptionsanalysen (Beispiel 2) wurde gezeigt, dass in fertilen Genotypen von *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* das CYPgst Gen in geschlossenen Blüten und Früchten exprimiert wurde und dass in Wurzeln und Blättern keine Expression nachweisbar war (**Abb. 5**). Dementsprechend ist eine Ausführungsform der erfindungsgemäßen Pflanze eine vorstehend beschriebene Pflanze, wobei das CYPgst Gen mindestens in geschlossenen Blüten und Früchten exprimiert wird, vorzugsweise spezifisch in geschlossenen Blüten und Früchten.

[0043] In einer Ausführungsform verhindert die Mutation die Transkription und/oder Translation eines funktionsfähigen Proteins in der erfindungsgemäßen Pflanze, wobei es sich vorzugsweise bei der Mutation um eine Deletion, Addition, Insertion oder Substitution in der kodierenden Nukleotidsequenz des CYPgst Gens, einem Splicing-Signal oder in einer regulatorischen Sequenz, vorzugsweise der Promotorsequenz, des CYPgst Gens handelt.

[0044] In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei der Deletion um eine Deletion von mindestens 500–600 bp, die den kodierenden Bereich bzw. den Promotorbereich des CYPgst Gens betrifft. Die Deletion kann aber auch eine Länge von mindestens 20, 30 oder 50 konsekutiven Basenpaaren, von mindestens 100, 150, 200 oder 250 konsekutiven Basenpaaren oder bevorzugt von mindestens 300, 400 oder 500 konsekutiven Basenpaaren aufweisen. Bei der Addition handelt es sich vorzugsweise um eine Insertion von einem Nukleotid oder mehreren Nukleotiden in die genomische Sequenz, vorzugsweise in die kodierende Gensequenz, die zu einer Leserasterverschiebung führt. Bei der Substitution handelt es sich vorzugsweise um eine Punktmutation in der genomischen Sequenz, vorzugsweise in der kodierenden Gensequenz, die Stopcodons oder Splicing-Fehler erzeugt.

[0045] Durch vergleichende Sequenzierung genomischer DNA-Fragmente, die das CYPgst Gen und die putative Promotorregion aus sowohl männlich sterilen als auch männlich fertilen *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* Pflanzen umfassen, ging hervor, dass eine Deletion von 533 bp verantwortlich für den männlich sterilen Phänotyp ist (siehe Beispiel 2 und **Abb. 3**) und die Deletion zwischen den Nukleotidpositionen 1560 und 2095 der

SEQ ID Nr. 1 liegt. Somit handelt es sich in einer weiter bevorzugten Ausführungsform um eine Deletion von 533 bp, die Teile der 5'UTR und des ersten Exons des CYPgst Gens aus *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* umfasst; siehe **Abb. 3**. Das funktionelle Gen BvCYPgst umfasst zwei Exons mit einer Gesamtlänge von 1554 bp. Ein in RefBeet 1.2 annotiertes Genmodell ist in **Abb. 2** gezeigt und die genomische DNA-Sequenz von CYPgst mit der Deletion, die zu einem verkürztem Exon 1 führt, ist in SEQ ID Nr. 8 aufgeführt. Mögliche Punktmutationen, die zu einem vorzeitigen Transkriptionsabbruch des CYPgst Gens aus *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* führen beziehungsweise ein gestörtes Splicing verursachen könnten, sind in Tabelle 1 aufgelistet, wobei diese vorzugsweise zwischen den Nukleotidpositionen 1560 und 2095 der SEQ ID Nr. 1 liegen. Wie in dem Beispiel 1 der vorliegenden Erfindung gezeigt, konnte im Zuge der Feinkartierung cng-flankierende Marker des CYPgst Gens identifiziert werden und somit die Position des CYPgst Gens im Genom von *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* ermittelt werden. Dies wiederum stellte die Grundlage für die Entwicklung von genetischen Markern, mit deren Hilfe die Deletion im CYPgst Gen nachgewiesen werden konnte.

[0046] Dementsprechend ist in einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung die Pflanze dadurch gekennzeichnet, dass in Zuckerrübe (*Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*) die Deletion durch Abwesenheit einer oder beider der Markerloci sle5983d14 (Amplifikationsprodukt der Primer mit SEQ ID Nr.: 4 und 5) und sle5983d17 (Amplifikationsprodukt der Primer mit SEQ ID Nr.: 6 und 7) und durch Anwesenheit eines ubiquitären Markers nachgewiesen werden kann. Der ubiquitäre Marker bestätigt hierbei die hinreichende Qualität der DNA-Extraktion.

[0047] Des Weiteren ist in einer Ausführungsform das Gen aus *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* (Zuckerrübe) in einem Segment auf Chromosom 1 zwischen den Markerloci sxn2151s01 und sle3305s02 lokalisiert. In einer bevorzugten Ausführungsform liegen diese Markerloci bei 33,42 bzw. 35,15 cM auf Chromosom 1 (basierend auf der genetischen Karte ZR INT 1202) und basierend auf der physikalischen Genomkarte (Physmapv2) hat diese Region eine physikalische Größe von 215,4 kbp und liegt zwischen den Positionen 3185718 bp und 3401120 bp. Für beide oben genannte Markerloci wurden KASP-Marker (KASP™, SNP Genotyping-Chemie von LGC Limited) entwickelt, mit welchen der zu detektierende SNP bzw. die entsprechende Referenzsequenz identifiziert werden kann. Die sxn2151s01-Markersequenz dargestellt in SEQ ID Nr. 24 und die sle3305s02-Markersequenz dargestellt in SEQ ID Nr. 26 zeigen das Vorhandensein des *gst*-Locus an; die sxn2151s01-Markersequenz dargestellt in SEQ ID Nr. 25 und die sle3305s02-Markersequenz dargestellt in SEQ ID Nr. 27 zeigen die Referenzsequenz an, wobei sich die Markersequenzen jeweils an Nukleotidposition 21 unterscheiden und ein "G" an dieser Stelle bei dem *gst*-Locus-tragenden Genotyp zu finden ist und ein "A" an dieser Stelle bei dem Referenz-Genotyp KWS2320 zu finden ist. In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Segment etwa 50 bis 5000 kbp groß, vorzugsweise 100 bis 1000 kbp, mehr bevorzugt 100 bis 500 kbp und besonders bevorzugt 200 bis 250 kbp, wobei das Segment weitere proteinkodierende Gene aufweist, vorzugsweise 21 Gene.

[0048] In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung handelt es sich bei dem nicht-mutierten Gen um das funktionelle Gen BvCYPgst aus *Beta vulgaris*, vorzugsweise aus *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* oder um ein funktionelles homologes, analoges oder orthologes Gen einer anderen Nutzpflanze beziehungsweise Kulturpflanze.

[0049] Der Fachmann kann weitere CYPgst Proteine der einschlägigen Literatur sowie Datenbanken unter Verwendung geeigneter Suchprofile und Computerprogramme für das Screening nach homologen Sequenzen bzw. für Sequenzvergleiche entnehmen. Darüber hinaus kann der Fachmann mittels herkömmlichen molekularbiologischen Techniken weitere CYPgst Protein kodierende DNA-Sequenzen selber herausfinden und im Rahmen der vorliegenden Erfindung einsetzen. So können beispielsweise geeignete Hybridisierungssonden von der Sequenz des CYPgst Gens abgeleitet und für das Screening von genomischen- und/oder cDNA Banken des gewünschten Organismus eingesetzt werden. Hierbei kann der Fachmann auf geläufige Hybridisierungs-, Klonierungs- und Sequenzierungsmethoden zurückgreifen, die beispielsweise in Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd Ed.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001 aufgeführt sind. Auch kann der Fachmann anhand bekannter Sequenzen Oligonukleotidprimer zum Amplifizieren von CYPgst Sequenzen synthetisieren und einsetzen.

[0050] Insbesondere handelt es sich in einer bevorzugten Ausführungsform bei dem homologen, analogen oder orthologen Gen um ein Gen aus *Zea mays*, das vorzugsweise eine der in SEQ ID Nr.: 9 oder 10 gezeigte Nukleotidsequenz umfasst bzw. die in SEQ ID Nr.: 11 gezeigte Aminosäuresequenz kodiert, aus *Solanum tuberosum*, das vorzugsweise eine der in SEQ ID Nr.: 12 oder 13 gezeigte Nukleotidsequenz umfasst bzw. die in SEQ ID Nr.: 14 gezeigte Aminosäuresequenz kodiert, aus *Triticum aestivum*, das vorzugsweise die in SEQ ID Nr.: 15 gezeigte Aminosäuresequenz kodiert, aus *Helianthus annuus*, das vorzugsweise die in SEQ ID Nr.: 16

gezeigte Aminosäuresequenz kodiert, aus *Hordeum vulgare*, das vorzugsweise die in SEQ ID Nr.: 17 gezeigte Aminosäuresequenz kodiert, aus *Brassica napus*, das vorzugsweise die in SEQ ID Nr.: 18 gezeigte Aminosäuresequenz kodiert, aus *Brassica oleracea*, das vorzugsweise die in SEQ ID Nr.: 19 gezeigte Aminosäuresequenz kodiert, aus *Brassica rapa*, das vorzugsweise die in SEQ ID Nr.: 20 gezeigte Aminosäuresequenz kodiert, aus *Glycine max*, das vorzugsweise die in SEQ ID Nr.: 21 gezeigte Aminosäuresequenz kodiert, aus *Gossypium*, das vorzugsweise die in SEQ ID Nr.: 22 gezeigte Aminosäuresequenz kodiert, und aus *Sorghum bicolor*, das vorzugsweise die in SEQ ID Nr.: 23 gezeigte Aminosäuresequenz kodiert. Die genannten Pflanzen lassen sich den Nutzpflanzen und vorzugsweise den Kulturpflanzen zuordnen.

[0051] Eine Ausführungsform der erfindungsgemäßen Pflanze ist eine vorstehend beschriebene Pflanze, wobei das nicht-mutierte Gen (Wildtypgen) eine Nukleotidsequenz aufweist, welche ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus einer Nukleotidsequenz, die die in SEQ ID Nr. 1, 2, 9, 10, 12 und 13 gezeigte Nukleotidsequenz aufweist.

[0052] In einer Ausführungsform weist das nicht-mutierte Gen (Wildtypgen) eine Nukleotidsequenz auf, die die in SEQ ID Nr. 3, 11 oder 14 gezeigte Aminosäuresequenz kodiert.

[0053] Die Nukleotidsequenz kann unter Verwendung herkömmlicher Verfahren, die im Stand der Technik bekannt sind, beispielsweise durch ortsgerichtete Mutagenese, PCR-vermittelte Mutagenese, Transposon-Mutagenese, Genome Editing etc. Substitutionen, Deletionen, Insertionen, Additionen und/oder jede andere Änderung entweder allein oder in Kombinationen in das Gen eingeführt werden, die die Nukleotidsequenz zwar ändern, jedoch die gleiche Funktion erfüllen, wie die Ausgangssequenz.

[0054] Daher umfasst die Erfindung auch eine vorstehend beschriebene Pflanze, wobei die Nukleotidsequenz auch ein funktionelles Fragment von den in SEQ ID Nr. 1, 2, 9, 10, 12 und 13 gezeigten Nukleotidsequenzen aufweisen kann. Die Begriffe "Fragment" umfasst Gene mit einer Nukleotidsequenz ausreichend ähnlich zu der oben genannten Nukleotidsequenz. Der Begriff "ausreichend ähnlich" bedeutet eine erste Nukleotidsequenz oder Aminosäuresequenz, die eine ausreichende oder minimale Anzahl an identischen oder äquivalenten Nukleotiden bzw. Aminosäureresten relativ zu einem zweiten Nukleotid bzw. einer zweiten Aminosäuresequenz hat. Im Hinblick auf die Aminosäuresequenz weist diese auch nach Änderung durch ein oben genanntes Verfahren eine gemeinsame Strukturdomäne auf und/oder besitzt gemeinsame funktionelle Aktivität. Nukleotidsequenzen oder Aminosäuresequenzen, die zumindest etwa 45%, zumindest etwa 50%, mindestens etwa 55%, mindestens etwa 60%, mindestens etwa 65%, mindestens etwa 70% aufweisen, mindestens etwa 75%, mindestens etwa 80%, mindestens etwa 85%, mindestens etwa 90%, mindestens etwa 91%, mindestens etwa 92%, mindestens etwa 93%, mindestens etwa 94%, mindestens etwa 95%, mindestens etwa 96%, mindestens etwa 97%, mindestens etwa 98%, mindestens etwa 99%, oder mindestens etwa 100% identisch ist, werden hier als ausreichend ähnlich definiert. Vorzugsweise wird bei den funktionellen Fragmenten eine ausreichend Ähnlichkeit begründet, wenn die Nukleotidsequenz bzw. Aminosäuresequenz im Allgemeinen die gleiche Eigenschaft aufweist, wie die zuvor benannten Nukleotid- bzw. Aminosäuresequenzen der vorliegenden Erfindung.

[0055] Entsprechend weist das nicht-mutierte Gen (Wildtypgen), welches in der Pflanze umfasst wird, in einer Ausführungsform eine Nukleotidsequenz auf, die in der Lage ist an eine Nukleotidsequenz, die komplementär zu einer Nukleotidsequenz der SEQ ID Nr. 1, 2, 9, 10, 12 oder 13 bzw. zu der Nukleotidsequenz die die in SEQ ID Nr. 3, 11 oder 14 gezeigte Aminosäuresequenz kodiert, unter stringenten Bedingungen zu hybridisieren. Des Weiteren umfasst eine weitere Ausführungsform das nicht-mutierte Gen (Wildtypgen), das eine Nukleotidsequenz umfasst, welche eine Aminosäuresequenz kodiert, die gegenüber der in SEQ ID Nr. 3, 11 oder 14 gezeigten Aminosäuresequenz Abweichungen in Form von Aminosäure-Deletionen, Substitutionen, Additionen und/oder Insertionen in der Aminosäuresequenz aufweist, vorzugsweise nicht mehr als 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2% oder nicht mehr als 1% über die gesamte Aminosäuresequenz.

[0056] In einer anderen bzw. zusätzlichen Ausführungsform kodiert die Nukleotidsequenz des nicht-mutierten Gens (Wildtypgen) ein Protein mit der gleichen enzymatischen Aktivität wie das Protein, das durch die DNA der vorangehenden Ausführungsformen kodiert wird.

[0057] In einer weiteren Ausführungsform weist das nicht-mutierte Gen (Wildtypgen), welches in der Pflanze umfasst wird, eine DNA auf, die mindestens 200 oder 400, bevorzugt mindestens 600 oder 800, besonders bevorzugt mindestens 1000 konsekutive Nukleotide aus dem Promotorder Nukleinsäuresequenz von SEQ ID Nr. 1 von Nukleotidpositionen 1 bis 1518, bevorzugt von Nukleotidpositionen 518 bis 1518, besonders bevorzugt von Nukleotidpositionen 1318 bis 1518 oder eine Sequenz, die an diesen Bereich hybridisiert, umfasst, wobei

die Nukleotidsequenz in der Lage ist, ist Expression des Gens bzw. eines heterologen Nukleinsäuremoleküls, das operativ mit der DNA verknüpft ist, spezifisch in geschlossenen Blüten und/oder Früchten zu steuern.

[0058] In einer Ausführungsform kann es sich bei der erfindungsgemäße Pflanze um eine Inzuchtpflanze oder eine Hybridpflanze handeln. Die Inzuchtpflanze kann als Elternpflanze zur Erzeugung von Hybriden genutzt. Der Vorteil der Verwendung einer für das Merkmal der rezessiven, kernkodierten männlichen Sterilität heterozygoten Inzuchtpflanze ist, dass sich diese in jeden Vermehrungsschritt in fertile und sterile Individuen aufspaltet. Das männlich sterile Individuum kann zur Erzeugung von Hybriden genutzt werden, womit eine manuelle Entfernung der Antheren entfällt und auch eine parallele Erhaltung einer sterilen Maintainer-Linie ist dadurch nicht mehr nötig.

[0059] In einer Ausführungsform ist die erfindungsgemäße Pflanze eine Pflanze der Gattung *Zea*, *Solanum*, *Triticum*, *Triticale*, *Helianthus*, *Secale*, *Hordeum*, *Brassica*, *Brachypodium*, *Glycine*, *Gossypium*, *Sorghum*, *Saccharum*, *Setaria*, *Aegilops*, *Oryza*, *Daucus*, *Eucalyptus*, *Erythranthe*, *Genlisea*, *Musa*, *Avena*, *Nicotiana*, *Coffea*, *Vitis*, *Cucumis*, *Morus*, *Crucihimalaya*, *Cardamine*, *Lepidium*, *Capsella*, *Olmarabidopsis*, *Arabis*, *Raphanus*, *Eruca*, *Citrus*, *Jatropha*, *Populus* oder *Beta*, vorzugsweise eine Pflanze der Art *Zea mays*, *Solanum tuberosum*, *Triticum aestivum*, *Triticum durum*, *Triticum spelta*, *Helianthus annuus*, *Secale cereale*, *Hordeum vulgare*, *Hordeum bulbosum*, *Brassica napus*, *Brassica oleracea*, *Brassica rapa*, *Brassica juncea*, *Brassica nigra*, *Glycine max*, *Gossypium sp.*, *Sorghum bicolor*, *Triticale*, *Saccharum officinarum*, *Setaria italica*, *Oryza sativa*, *Oryza minuta*, *Oryza australiensis*, *Oryza alta*, *Brachypodium distachyon*, *Hordeum marinum*, *Aegilops tauschii*, *Daucus glochidiatus*, *Daucus pusillus*, *Daucus muricatus*, *Daucus carota*, *Eucalyptus grandis*, *Erythranthe guttata*, *Genlisea aurea*, *Musa sp.*, *Avena sp.*, *Nicotiana sylvestris*, *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana tomentosiformis*, *Solanum lycopersicum*, *Coffea canephora*, *Vitis vinifera*, *Cucumis sativus*, *Morus notabilis*, *Crucihimalaya himalaica*, *Crucihimalaya wallichii*, *Cardamine flexuosa*, *Lepidium virginicum*, *Capsella bursa-pastoris*, *Olmarabidopsis pumila*, *Arabis hirsuta*, *Raphanus sativus*, *Eruca vesicaria sativa*, *Citrus sinensis*, *Jatropha curcas*, *Populus trichocarpa* oder *Beta vulgaris*. Diese Pflanzen sind den Nutzpflanzen, insbesondere den Kulturpflanzen zuzuordnen.

[0060] Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfasst nicht nur die erfindungsgemäße Pflanze, die eine Mutation in dem CYPgst Gen aufweist, sondern auch ein DNA-Molekül, das eine wie zuvor definierte Nukleotidsequenz mit einer Mutation in Form einer Deletion, Addition, Insertion oder Substitution aufweist, wobei diese Mutation dazu führt, dass kein funktionsfähiges CYPgst Protein synthetisiert wird.

[0061] In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Mutation in der kodierenden Nukleotidsequenz des CYPgst Gens, einem Splicing-Signal oder in einer regulatorischen Sequenz des CYPgst Gens, vorzugsweise im Promotor des CYPgst Gens lokalisiert. Insbesondere kann es sich bei der Mutation um eine Deletion zwischen den Nukleotidpositionen 1560 und 2095 der SEQ ID Nr.: 1 oder entsprechenden Positionen der SEQ ID Nr.: 12 oder 9 handeln. Die Deletion kann eine Länge von mindestens 20, 30 oder 50 konsekutiven Basenpaaren, bevorzugt von mindestens 100, 150, 200 oder 250 konsekutiven Basenpaaren und besonders bevorzugt von mindestens 300, 400 oder 500 konsekutiven Basenpaaren aufweisen. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfasst das Nukleinsäuremolekül eine Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID Nr.: B. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform weist das Nukleinsäuremolekül eine Punktmutation in der Nukleotidsequenz der SEQ ID Nr. 1 gemäß der Tabelle 1 auf, vorzugsweise zwischen den Nukleotidpositionen 1560 und 2095 der SEQ ID Nr.: 1.

[0062] Wie zuvor beschrieben, können DNA-Hybridisierungssonden, die von der Sequenz des CYPgst Gens abgeleitet sind, für das Screening von genomischen- und/oder cDNA Banken anderer Organismen zum Identifizieren von homologen Genen eingesetzt werden. Um eine spezifische Hybridisierung zu erzielen, sollten solche Sonden spezifisch sein und mindestens eine Länge von 15 Nukleotiden, bevorzugt mindestens 20 Nukleotide aufweisen. Die Sonden können zum Amplifizieren der identifizierten homologen Gene durch den bekannten Prozess der Polymerase Kettenreaktion (PCR) eingesetzt werden. Des Weiteren können diese Sonden auch zur Detektion von Mutationen im CYPgst Gen eingesetzt werden. Eine ausführliche Anleitung zu der Hybridisierung von Nukleinsäuren kann man in Tijssen, *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology – Hybridization with Nucleic Acid Probes*, Teil 1, Kapitel 2, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays," Elsevier, New York (1993); und in *Current Protocols in Molecular Biology*, Kapitel 2, Ausubel, et al., eds, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1995) finden.

[0063] Daher ist ein Nukleinsäuremolekül von mindestens 15, 16, 17, 18, 19 oder 20, bevorzugt mindestens 21, 22, 23, 24 oder 25, besonders bevorzugt mindestens 30, 35, 40, 45 oder 50, und ganz besonders bevorzugt mindestens 100, 200, 300, 500 oder 1000 Nukleotiden Länge Gegenstand der vorliegenden Erfindung,

wobei dieses Nukleinsäuremolekül spezifisch an eine zuvor beschriebene Nukleotidsequenz, die das nicht-mutierte CYP703 Wildtypgen umfasst oder an ein zuvor beschriebenes DNA-Molekül mit einer Mutation in Form einer Deletion, Addition, Insertion oder Substitution, die dazu führt, dass kein funktionsfähiges CYP703 Protein gebildet wird, hybridisiert. Vorzugsweise weist das Nukleinsäuremolekül die unter Punkt [17] beschriebene Ausführungsform auf.

[0064] Durch die oben beschriebene Feinkartierung konnte die Position des CYPgst Gens im Genom von *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* bestimmt werden. Dies wiederum stellte die Grundlage für die Entwicklung von genetischen Markern, mit deren Hilfe die Deletion im CYPgst Gen nachgewiesen werden konnte.

[0065] Daher betrifft die vorliegende Erfindung neben den oben beschriebenen Pflanzen auch Marker als Oligonukleotide, insbesondere Primer-Oligonukleotide. Diese umfassen ein Nukleinsäuremolekül von mindestens 15 Nukleotiden Länge, das spezifisch an eine wie zuvor definierte Nukleotidsequenz oder an ein zuvor definiertes DNA-Molekül mit einer Mutation in Form einer Deletion, Addition, Insertion oder Substitution, die dazu führt, dass kein funktionsfähiges CYPgst Protein gebildet wird, hybridisiert. Vorzugsweise weisen diese Oligonukleotide eine Länge von maximal 50 Nukleotiden auf. Weiter bevorzugt sind die Oligonukleotide kürzer und weisen eine Länge zwischen 15 und 25 Nukleotiden auf. Wie in Beispiel 2 der vorliegenden Erfindung gezeigt, weisen die Oligonukleotide bevorzugt eine der folgenden Nukleotidsequenzen auf: (i) SEQ ID Nr. 4, 6 oder ein Komplement davon, oder (ii) SEQ ID Nr. 5, 7 oder ein Komplement davon.

[0066] Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ferner ein CYPgst Protein kodierbar durch eine zuvor beschriebene Nukleotidsequenz und ein funktionelles und/oder immunologisch aktives Fragment davon sowie ein Antikörper, der spezifisch an das CYPgst Protein oder an dessen hier beschriebenen Fragment bindet. Die rekombinante Herstellung von Proteinen und Fragmenten ist dem Fachmann geläufig und beispielsweise in Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001 oder Wingfield, P. T. 2008. *Production of Recombinant Proteins. Current Protocols in Protein Science*. 52:5.0:5.0.1–5.0.4 beschrieben. Polyklonale oder monoklonale Antikörper zu dem Protein der vorliegenden Erfindung können von dem Fachmann nach bekannten Verfahren hergestellt werden, wie sie beschrieben sind in E. Harlow et al., Herausgeber *Antibodies: A Laboratory Manual* (1988). Die Herstellung von monoklonalen Antikörpern sowie von Fab- und F(ab')₂-Fragmenten, die auch bei Proteindetektionsmethoden nützlich sind, kann durchgeführt werden durch verschiedene gebräuchliche Methoden wie sie beschrieben sind in Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, S. 98–118, New York: Academic Press (1983). Der Antikörper kann dann für das Screening von Expressions-cDNA-Bibliotheken genutzt werden um identischen, homologe oder heterologe Gene mittels immunologischen Screening zu identifizieren (Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 oder Ausubel et al., 1994, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons).

[0067] In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem CYPgst-Protein um die in SEQ ID Nr. 3, 11 oder 14 bis 23 aufgeführten Aminosäuresequenzen, oder um eine Aminosäuresequenz, die mit der in SEQ ID Nr. 3 aufgeführten Aminosäuresequenz zu mindestens 80%, 82%, 84%, 86% oder 88%, bevorzugt zu mindestens 90%, 91%, 92%, 93%, 94% oder 95%, besonders bevorzugt zu mindestens 96%, 97%, 98%, 99% oder 99,5%, vorzugsweise über die Volllänge identisch ist.

[0068] Die Erfindung betrifft weiterhin ein rekombinantes DNA-Molekül, das das nicht-mutierte CYPgst Gen (Wildtypgen) umfasst und die zuvor erwähnten Eigenschaften der Nukleotidsequenz aufweist, die von der erfindungsgemäßen Pflanze umfasst wurde. Bevorzugt weist das rekombinante DNA-Molekül einen Promotor und/oder andere Transkriptions- oder Translationskontrollelemente auf bzw. ist mit diesen assoziiert. Bei den verwendeten Promotoren wird es sich hauptsächlich um zellspezifische Promotoren handeln, die die Transkription der DNA nur in vorbestimmten Zellen ermöglichen. Neben den Promotoren gibt es eine Vielzahl weiterer Transkriptionskontrollelemente, wie beispielsweise die Enhancer, Operatoren, Repressoren und Transkriptionsterminationssignale, jedoch nicht auf diese beschränkt, welche mit der DNA funktionell verbunden sind, um eine gerichtete zellspezifische Transkription zu ermöglichen. Promotoren und andere Transkriptionsregulationselemente sind allgemein bekannt und dem Fachmann im Stand der Technik zugänglich; siehe beispielsweise WO 00/75359 auf Seite 23, Zeile 5 bis Seite 24, Zeile 17. Dieses rekombinante DNA-Molekül kann dafür verwendet werden, um in Pflanzen mit einem kernkodierten, rezessiven, männlich sterilen Phänotyp die Fertilität zu restaurieren.

[0069] Da, wie zuvor beschrieben, das CYPgst Gen in geschlossenen Blüten und Früchten exprimiert wird und nicht in Wurzeln und/oder Blättern, umfasst das rekombinante DNA-Molekül in einer bevorzugten Ausführungsform entweder einen Promotor, der eine zuvor beschriebene Nukleotidsequenz aufweist und mit einem

heterologen Nukleinsäuremolekül operativ verknüpft ist oder eine wie zuvor definierte kodierende Nukleotidsequenz, die das Wildtyp-CYPgst Gen umfasst und die operativ mit einem heterologen Promoter verknüpft ist. Vorzugsweise ist dieser Promotor in der Lage, die Expression der Nukleotidsequenz spezifisch in geschlossenen Blüten und/oder Früchten zu steuern. Weiter bevorzugt umfasst das rekombinante DNA-Molekül den nativen Promoter des nicht-mutierten CYPgst Gens aus *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* (SEQ ID Nr. 1). Dementsprechend umfasst die vorliegende Erfindung auch die Verwendung des hier beschriebenen DNA-Moleküls bzw. des hier beschriebenen Promotors zur spezifischen Expression von heterologen Nukleinsäuremolekülen in Blüten und/oder Früchten von Pflanzen. Dazu ist eine operative Verknüpfung von dem heterologen Nukleinsäuremolekül mit dem entsprechenden Promotor nötig und die Einbringung dieses rekombinanten DNA-Moleküls in die Ziel-Zelle, die vorzugsweise eine Pflanzenzelle ist. Verfahren zur heterologen Expression von rekombinanten DNA-Molekülen werden später genauer beschrieben.

[0070] Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein rekombinantes DNA-Molekül, das eine erfindungsgemäße Nukleotidsequenz aufweist, die eine shRNA (small hairpin RNA), siRNA (small interfering RNA), Antisense-RNA, Sense-RNA oder doppelsträngige RNA kodiert. Diese vermitteln durch Basenpaarung die Inhibierung der Translation der CYPgst mRNA oder den Abbau der CYPgst mRNA in der Zelle. Demnach führt das Einbringen und/oder die Expression des rekombinanten DNA-Moleküls in einer Pflanze zur Inhibierung der Expression des funktionellen (nicht-mutierten) CYPgst Gens. In einer bevorzugten Ausführungsform weist die Nukleotidsequenz Eigenschaften auf, die unter Punkt [15] im Detail beschrieben sind.

[0071] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Vektoren, die rekombinante DNA-Moleküle oder Nukleinsäuresequenzen bzw. Nukleinsäuremoleküle der vorliegenden Erfindung umfassen. Ein erfindungsgemäßer Vektor kann das nicht-mutierte CYPgst Gen (Wildtypgen) mit den zuvor erwähnten Eigenschaften der Nukleotidsequenz und vorzugsweise einen der zuvor beschriebenen Promotoren enthalten. Ein anderer Vektor kann ein rekombinantes DNA-Molekül enthalten, das den Promotor des nicht-mutierten CYPgst Wildtyp-Gens, der mit einem heterologen Nukleinsäuremolekül verknüpft ist, umfasst oder kann ein rekombinantes DNA-Molekül enthalten, das eine zuvor beschriebene Nukleotidsequenz umfasst, die operativ mit einem heterologen Promotor verknüpft ist, wobei in beiden Fällen der Promotor vorzugsweise in die Lage ist, die Expression der Nukleotidsequenz spezifisch in geschlossenen Blüten und/oder Früchten zu steuern. Des Weiteren kann ein Vektor ein rekombinantes DNA-Molekül enthalten, das eine Nukleotidsequenz aufweist, die für eine shRNA, siRNA, Antisense-RNA, Sense-RNA oder doppelsträngige RNA kodiert und somit nach Expression in einer Pflanzenzelle zur Inhibierung der Expression des CYPgst Gens führt. Weiterhin kann ein Vektor ein DNA-Molekül mit einer zuvor definierten Mutation enthalten oder kann das zuvor beschriebene Nukleinsäuremolekül enthalten, das spezifisch an die nicht-mutierte (Wildtyp) CYPgst Nukleotidsequenz oder an die mutierte CYPgst Nukleotidsequenz bindet. Bei dem beschriebenen Vektor kann es sich um ein Plasmid, ein Cosmid, eine Phage oder einen Expressionsvektor, einen Transformationsvektor, Shuttle-Vektor oder Klonierungsvektor handeln, er kann doppel- oder einzelsträngig, linear oder zirkulär sein oder kann einen prokaryotischen oder eukaryotischen Wirt entweder durch Integration in dessen Genom oder extrachromosomal transformieren. Bevorzugt ist das erfindungsgemäße DNA-Molekül oder Nukleinsäuremolekül in einem Expressionsvektor mit einer oder mehreren regulatorischen Sequenzen, welche die Transkription und optional die Expression in einer prokaryotischen oder eukaryotischen Wirtszelle erlauben, operativ verknüpft; siehe beispielsweise Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001 und die internationale Anmeldung WO 00/75359 auf Seite 21, Zeile 20 bis Seite 22, Zeile 32. Vorzugsweise sind diese regulatorischen Sequenzen Promotoren oder Terminatoren insbesondere ein Transkriptions-Initiations-Startpunkt, eine Ribosomen-Bindestelle, ein RNA-prozessierendes Signal, eine Transkriptions-Terminations Stelle und/oder ein Polyadenylierungssignal. Die Vektoren enthalten zusätzlich für gewöhnlich Indikator-/Reportergene oder Resistenzgene zum Nachweisen der Übertragung des gewünschten Vektors bzw. DNA-Moleküls/Nukleinsäuremoleküls und zum Selektieren der Individuen die diese enthalten, da ein direkter Nachweis über die Expression des Gens meist eher schwierig ist. Beispiele für Indikator-/Reportergene sind beispielsweise das Luciferase-Gen und das Gen kodierend für das Grün-fluoreszierende-Protein (GFP). Diese erlauben ferner auch Untersuchungen zur Aktivität und/oder Regulation eines Promotors des Gens. Beispiele für Resistenzgene, im speziellen für Pflanzentransformationen sind das Neomycin-Phosphotransferase-Gen, das Hygromycin-Phosphotransferase Gen oder das Gen kodierend für die Phosphinothricin-Acetyltransferase. Dies schließt weitere dem Fachmann bekannte Indikator-/Reportergene oder Resistenzgene jedoch nicht aus. In einer bevorzugten Ausführungsform ist der Vektor ein Pflanzenvektor.

[0072] Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein zuvor beschriebener Vektor, wobei das DNA-Molekül als Transgen in der Lage ist ein funktionelles CYPgst Gen zu exprimieren und vorzugsweise genetisch gekoppelt ist mit einem weiteren Transgen, welches die Weitergabe des DNA-Moleküls über den Pollen verhindert. Durch Einbringung dieses Vektors in eine Mutante, die durch eine Mutation in dem CYPgst

Gen männlich steril ist, kann die Fertilität wieder restauriert werden. Dadurch, dass die Weitergabe des transgenen funktionellen CYPgst Gens über die Pollen verhindert wird, entsteht bei der Selbstbefruchtung der transgenen Linie nur hemizygoten Saatgut. Vorzugsweise weist der Vektor bzw. das Transgen des Weiteren eine Expressionskassette auf, die zu einer Markierung der Samen führt, vorzugsweise durch Fluoreszenz-Markierung. Durch diesen Ansatz lassen sich transgene von nicht-transgenen Samen einfach unterscheiden. Dieses System für die Nutzung von kerncodierter, männlicher Sterilität wurde von der Firma Pioneer entwickelt. Das System mit dem Namen SEED PRODUCTION TECHNOLOGY (SPT) (US 2006288440 A1) wurde für Mais entwickelt und basiert darauf, dass eine sterile Mutante, die durch eine Mutation in einem bekannten, kerncodierten Gen durch Einfügen eines Transgens restauriert werden kann. Das Transgen enthält dabei das nicht mutierte Allel des Sterilitätsgens, so dass das Transgen als wildtyp-Allel fungiert. Das Fertilität restaurierende Transgen ist genetisch gekoppelt mit einem weiteren Transgen, welches die Weitergabe des Transgens über den Pollen verhindert (Pollenkiller). Dadurch entsteht bei Selbstbefruchtungen der transgenen Linie nur hemizygoten Saatgut, was für die Effizienz des Systems sehr wichtig ist.

[0073] Das Transgen enthält des Weiteren eine Expressionskassette, die zur Rotfluoreszenz der Samen führt. Somit lassen sich transgene von nicht transgenen Samen einfach unterscheiden. Da die transgenen Samen fertil sind, findet dadurch auch automatisch eine Separierung in fertile und sterile Pflanzen statt. Durch Aussaat der nicht transgenen Samen erhält man somit die für die Hybridproduktion notwendigen Mutterpflanzen, die transgenen Samen können zum einen als Vaterlinie für die weitere Vermehrung der Mutterlinie verwendet werden (Maintainer-Linie) und auch durch einfache Selbstung vermehrt werden (**Abb. 5**). Das SPT System kann theoretisch in allen Pflanzenarten angewandt werden. Voraussetzung ist jedoch das Vorhandensein einer genisch männlich sterilen Linie sowie die Kenntnis über das Gen, welches für den genisch männlichen Sterilitätsphänotyp verantwortlich ist. Somit könnte das SPT-System theoretisch auch für die Entwicklung eines Hybridsystems für jede Kulturart wie Zuckerrübe oder Kartoffel verwendet werden.

[0074] In einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung Wirtszellen, die die beschriebenen Vektoren, rekombinante DNA-Moleküle und/oder Nukleinsäuremoleküle enthalten. Eine Wirtszelle im Sinne der Erfindung kann eine prokaryotische (z. B. bakteriell) oder eukaryotische Zelle (z. B. eine pflanzliche Zelle oder eine Hefezelle) sein. Vorzugsweise ist die Wirtszelle ein Agrobakterium oder eine Pflanzenzelle. Weiter bevorzugt betrifft die vorliegende Erfindung eine transgene Pflanzenzelle, die das erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül als Transgen oder den Vektor der vorliegenden Erfindung umfasst. Eine solche transgene Pflanzenzelle ist beispielsweise eine Pflanzenzelle, welche mit dem erfindungsgemäßen Nukleinsäuremolekül oder mit dem Vektor der vorliegenden Erfindung, vorzugsweise stabil, transformiert ist. In einer bevorzugten Ausgestaltung der transgenen Pflanzenzelle ist das Nukleinsäuremolekül mit einer oder mehreren regulatorischen Sequenzen, welche die Transkription und optional die Expression in der Pflanzenzelle erlauben, operativ verknüpft. Das Gesamtkonstrukt aus dem erfindungsgemäßen Nukleinsäuremolekül und der/den regulatorischen Sequenzen stellt dann das Transgen dar. Solche regulatorische Sequenzen sind beispielsweise ein Promotor oder ein Terminator. Dem Fachmann sind zahlreiche in Pflanzen anwendbare, funktionelle Promotoren und Terminatoren bekannt.

[0075] In einem zusätzlichen Aspekt der Erfindung wird die Identifizierung des CYPgst Gens, verantwortlich für die Merkmalsausprägung der rezessiven, kerncodierten männlichen Sterilität, dazu genutzt, transgene Pflanzen mit dieser Merkmalsausprägung herzustellen und dazu genutzt um die Fertilität zu restaurieren.

[0076] In einer Ausführungsform wird ein Kit beansprucht, das die erforderlichen und hier zuvor beschriebenen rekombinanten DNA-Moleküle bzw. Nukleinsäuremoleküle und Vektoren umfasst um Pflanzen mit kerncodierter, rezessiver männlicher Sterilität herzustellen und auch um in Pflanzen die diesen Phänotyp aufweisen die Fertilität zu restaurieren. Auch enthält dieses Kit rekombinante DNA-Moleküle, die entweder den Promotor mit einer zuvor definierten Nukleotidsequenz oder einen heterologen Promotor umfassen, wobei Ersterer mit einem heterologen Nukleinsäuremolekül und Letzterer mit einer zuvor definierten Nukleotidsequenz, die für das nicht-mutierte (Wildtyp) CYPgst Gen kodiert, verknüpft ist. Des Weiteren kann das Kit einen Vektor enthalten, wobei das DNA-Molekül als Transgen in der Lage ist ein funktionelles CYPgst Gen zu exprimieren und vorzugsweise genetisch gekoppelt ist mit einem weiteren Transgen, welches die Weitergabe des DNA-Moleküls über den Pollen verhindert und eine Expressionskassette aufweist, die zu einer Markierung der Samen führt. Zur Identifizierung der Mutation in dem CYPgst Gen kann das Kit ein zuvor definiertes Nukleinsäuremolekül enthalten, das an eine vorstehend beschriebene Nukleotidsequenz umfassend das nicht-mutierte (Wildtyp) CYPgst Gen oder an das entsprechende Gen mit einer zuvor definierten Mutation, hybridisiert oder es kann die zuvor definierten Oligonukleotide enthalten. Das Kit kann weiterhin das zuvor beschriebene CYPgst Protein oder Fragment davon sowie den beschriebenen Antikörper enthalten. Vorzugsweise sind in dem Kit auch Reagenzien für nukleinsäurebasierte oder immunologischen Nachweiseverfahren enthalten.

[0077] Eine transgene Pflanze ist beispielsweise eine Pflanze, die Pflanzenzellen enthält, welche mit dem erfindungsgemäßen DNA-Molekül/Nukleinsäuremolekül oder mit dem Vektor der vorliegenden Erfindung transformiert ist. In einer bevorzugten Ausführungsform der transgenen Pflanze ist das DNA-Molekül/Nukleinsäuremolekül mit einer oder mehreren regulatorischen Sequenzen, welche die Transkription und optional die Expression in der Pflanze erlauben, operativ verknüpft. Das Gesamtkonstrukt aus dem erfindungsgemäßen Nukleinsäuremolekül und der/den regulatorischen Sequenzen stellt dann das Transgen dar. Unter dem Begriff "Transgen" wird somit die ein rekombinantes Polypeptid kodierende Nukleinsäuresequenz verstanden.

[0078] Zur Herstellung einer transgenen Pflanze können die zuvor beschriebenen Oligonukleotide, Nukleinsäuren, DNA-Moleküle und Vektoren, auch dienlich sein. Daher betrifft die vorliegende Erfindung auch die Verwendung dieser in der Herstellung einer transgenen Pflanze die einen rezessiven, kernkodierten, im homozygoten Zustand männlich sterilen Phänotyp zeigt, dadurch gekennzeichnet, dass die Expression des CYPgst Gens inhibiert wird, in der Herstellung einer erfindungsgemäßen Pflanze mit restaurierter Fertilität oder in der Herstellung einer transgenen Wirtszelle, vorzugsweise Pflanzenzelle. Zudem finden die zuvor beschriebenen Oligonukleotide, Nukleinsäuren, DNA-Moleküle und Vektoren auch Einsatz in den entsprechenden Verfahren zur Herstellung dieser transgenen Pflanzen oder Pflanzenzellen. Die transgenen Pflanze ist vorzugsweise eine Nutzpflanze und weiter bevorzugt eine Kulturpflanze.

[0079] Es gibt verschiedenen Verfahren im Stand der Technik, mit denen sich transgene Pflanzen, in denen entweder die Transkription/Translation eines Proteins unterbunden wird oder das Restaurationsmerkmal eingebracht wird, herstellen und identifizieren bzw. selektieren lassen. Verfahren zur Herstellung von transgenen Kulturpflanzen und deren Identifizierung durch molekularbiologische Methoden sind dem Fachmann bekannt; siehe beispielsweise für transgene glyphosatresistente Zuckerrüben die internationale Anmeldung WO 99/023232 und WO2004/074492 bzw. für Transformation von Pflanzen im allgemeinen WO2000/018939 und WO2013/138309.

[0080] Eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist demnach ein Verfahren zur Herstellung einer Pflanze die einen rezessiven, kernkodierten, im homozygoten Zustand männlich sterilen Phänotyp zeigt, dadurch gekennzeichnet, dass die Expression des CYPgst Gens inhibiert wird, wobei diese Pflanze vorzugsweise eine Nutzpflanze und weiter bevorzugt eine Kulturpflanze ist. Zur Erstellung dieser erfindungsgemäßen transgenen Pflanze kann ein rekombinantes DNA-Molekül, das ein Polynukleotid exprimiert, beispielsweise mit Hilfe eines Vektor in die Pflanzenzelle mittels Transformation eingebracht werden, sodass die Expression des Polynukleotids zur Inhibierung des CYPgst Proteins führt.

[0081] Beispielsweise kann die zuvor beschriebene Mutation, die zur Inhibierung der CYPgst Expression führt, durch genetische Rekombination während eines Kreuzungsprozesses zwischen zwei Pflanzen erreicht werden, wobei eine Pflanze das mutierte CYPgst Allel trägt. Neben der Verwendung von konventionellen Züchtungstechniken zur Erzeugung einer genetischen Rekombination stellt die moderne Biotechnologie dem Fachmann diverse weitere Werkzeuge zur Verfügung, welche ein präzises Genom-Engineering ermöglichen. Beispielsweise könnte das T-DNA-Tagging dafür genutzt werden um das CYPgst Gen durch Insertionsmutagenese zu zerstören. Weiterhin könnte das CYPgst Gen durch Genmutation vollständig oder teilweise mittels TALE-Nukleasen (TALENs) oder Zinkfinger-Nukleasen (ZFNs) sowie CRISPR/Cas Systeme, die u. a. beispielhaft in WO 2014/144155 A1 (Engineering plant genomes using CRISPR/Cas systems) und in Osakabe & Osakabe, Plant Cell Physiol, 56 (2015), 389–400 beschrieben sind, deletiert werden, sodass eine Expression des CYPgst Gens ausgeschlossen ist. Dies könnte auch durch Verwendung der als TILLING (Targeted Induced Local Lesions in Genomes) bezeichneten Methode erreicht werden, wobei, wie es beispielsweise in der deutschen Patentanmeldung DE 10 2013 101 617 beschrieben ist, Punktmutationen in dem Wildtypgen hervorgerufen und anschließend Pflanzen selektiert werden, die eine geeignete, d. h. resistenzvermittelnde Mutation aufweisen, wie z. B. eine gegen Gelbmosaikvirose resistente Gerste; siehe die DE 10 2013 101 617 auf Seiten 4, 8 und 12 in Paragraphen [0014], [0026] und [0038]. Die TILLING Methode ist auch ausführlich in der Publikation von Henikoff et al. beschrieben (Henikoff et al., Plant Physiol. 135, 2004, 630–636. Punktmutationen in dem CYPgst Gen von *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*, die zu Stoppcodons oder Splicing-Fehlern führen könnten, sind in Tabelle 1 aufgeführt.

[0082] Eine Inhibierung der Expression ist durch RNAi Ansatz oder Co-Suppression auch möglich. Dieser umfasst das Einbringen des zuvor definierten rekombinanten DNA-Moleküls bzw. Nukleinsäuremoleküls oder des entsprechenden Vektors in die Pflanze, wobei die Expression der kodierten shRNA-, Antisense-RNA- oder Sense-RNA-Moleküle zur Inhibierung der Expression des CYPgst Gens führen. Solche RNAi und/oder Co-Suppression basierten Verfahren sind gängige Methoden zur Inhibierung der Genexpression und sind dem Fachmann bekannt. Auch kann ein Sense Ansatz, umfassend ein zielspezifisches nicht-polyadenyliertes RNA-

Molekül zur Inhibierung der Expression des CYPgst Gens führen. Diese Methode ist zum Beispiel in der internationalen Anmeldung WO2001/012824 beschrieben.

[0083] Eine weitere Ausführungsform der Erfindung ist ein Verfahren zur Restauration der Fertilität einer erfindungsgemäßen Pflanze, das das Einbringen eines funktionellen CYPgst Gens in die Pflanze umfasst. Dabei kann das CYPgst Gen durch gentechnische Methoden eingebracht werden; mittels einer erfindungsgemäßen rekombinanten DNA, die vorzugsweise Transkriptionskontrollelemente, vorzugsweise einen Promoter zur spezifischen Expression des Gens in geschlossenen Blüten und/oder Früchten enthält, oder mittels der erfindungsgemäßen Vektoren. Das CYPgst Gen kann aber auch durch Kreuzung mit einer Pflanze, die das CYPgst Wildtypgen oder ein funktionelles CYPgst Gen, vorzugsweise im homozygoten Zustand trägt, eingebracht werden. Optional kann nach der Kreuzung eine Selektion auf Anwesenheit des CYPgst Wildtypgens oder des funktionellen CYPgst Gens in der Nachkommengeneration erfolgen.

[0084] Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Pflanze, die eine zuvor definierte Pflanzenzelle enthält und/oder die durch die zuvor beschriebenen Verfahren erhalten wurde. Das heißt, eine Pflanze mit einem kernkodierten, rezessiven männlich sterilen Phänotyp sowie eine Pflanze mit restaurierter Fertilität wurde entweder durch genetische Rekombination unter Verwendung von konventionellen Züchtungsmethoden hergestellt oder sie ist eine transgene Pflanze in der durch die verschiedenen zuvor genannten Verfahren die Expression des CYPgst Gens inhibiert wurde, was zu einem kernkodierten, rezessiven, männlich sterilen Phänotyp führt oder in der die Fertilität durch Einbringen von rekombinanten DNA-Molekülen restauriert wurde. Diese Pflanze ist bevorzugt eine Kulturpflanze, besonders bevorzugt eine Nutzpflanze vorzugsweise mit Speicherorganen, die ggf. auch als Vermehrungsorgan dienen können, wie Rübenkörper oder Knollen von Zuckerrübe und Kartoffel, Korn von Triticale, Hafer, Hirse und Mais, Früchte bspw. von Tomaten, etc. In einer Ausführungsform sind niedere Pflanzen sowie die Ackerschmalwand *Arabidopsis thaliana* explizit von der vorliegenden Erfindung ausgeschlossen.

[0085] Neben den Pflanzen die einen kernkodierten, rezessiven, männlich sterilen Phänotyp durch spontane Mutation im CYPgst Gen aufweisen oder den Pflanzen in denen dieser Phänotyp durch genetische Rekombination unter Verwendung von konventionellen Züchtungsmethoden herbeigeführt wurde oder den Pflanzen in denen dieser Phänotyp durch Genom-Engineering unter Verwendung von moderner Biotechnologie herbeigeführt wurde und den Pflanzen in denen die Fertilität durch die entsprechenden Verfahren restauriert wurde, betrifft die Erfindung auch Organe, Pflanzenteile, Gewebe, Zellen sowie Samen oder Nachkommen dieser Pflanzen. In einer Ausführungsform weisen die Samen oder Nachkommen eine oder mehrere der zuvor definierten Mutationen auf, die zur Inhibierung der Expression des CYPgst Gens führen und/oder die Samen oder Nachkommen weisen ein zuvor beschriebenes rekombinantes DNA-Molekül bzw. Nukleinsäuremolekül oder Vektor auf.

[0086] In dieser Erfindung ist ein Verfahren zur Identifizierung einer erfindungsgemäßen Pflanze ebenfalls eine weitere Ausführungsform. Mit diesem Verfahren kann sowohl die Pflanze, die einen kernkodierten, rezessiven, männlich sterilen Phänotyp durch spontane Mutation im CYPgst Gen aufweisen identifiziert werden als auch eine Pflanze in der dieser Phänotyp durch genetische Rekombination unter Verwendung von konventionellen Züchtungsmethoden herbeigeführt wurde oder eine Pflanze in der dieser Phänotyp durch Genom-Engineering unter Verwendung von moderner Biotechnologie herbeigeführt wurde. Zudem kann eine Pflanze mit diesem Verfahren identifiziert werden, in der die Fertilität durch die entsprechenden Verfahren restauriert wurde. Zur Identifizierung dieser erfindungsgemäßen Pflanze kann ein zuvor definiertes Nukleinsäuremolekül als Hybridisierungssonde verwendet werden, das mindestens eine Länge von 15 Nukleotiden hat und spezifisch an eine zuvor definierte Nukleotidsequenz umfassend das nicht-mutierte (Wildtyp) CYPgst Gen sowie das CYPgst Gen mit einer zuvor definierten Mutation, die zur Inhibierung der Expression des Gens führt, binden. Weiterhin kann für die Identifizierung das zuvor definierte Oligonukleotid, das zuvor definierte CYPgst Protein bzw. ein Fragment davon und der Antikörper sowie Bestandteile des zuvor beschriebenen Kits verwendet werden.

[0087] Die vorliegende Erfindung betrifft auch die Verwendung von erfindungsgemäßen rekombinanten DNA-Molekülen bzw. Nukleinsäuremolekülen, erfindungsgemäßen Vektoren und Komponenten des erfindungsgemäßen Kits in der Herstellung einer rezessiven, kernkodierten, männlich sterilen Pflanze, in der Herstellung einer Pflanze mit restaurierter Fertilität, in der Herstellung einer Hybridpflanze, in Resistenzzuchtprogrammen, oder zur Saatgutproduktion.

[0088] Ein Verfahren zur Herstellung reversibler männlicher Sterilität in einer Pflanze, in dem das CYPgst Gen genutzt werden kann ist beispielsweise in der internationalen Anmeldung WO96/017945 beschrieben, umfassend:

(a) Einbringen eines ersten rekombinanten DNA-Moleküls in das Genom einer Pollenproduzierenden Pflanze, die genetisch transformiert werden kann, wobei das erste rekombinante DNA-Molekül umfasst:

- (i) eine Nukleotidsequenz, die ein Genprodukt kodiert, welches, nach Expression in einer Pflanze, die Pollenbildung oder deren Funktion hemmt, hier erfindungsgemäß das CYPgst Gen bzw. Genprodukt beispielsweise durch Expression einer RNAi-Sequenz;
- (ii) einen Operator, der die Expression der Nukleotidsequenz kontrolliert; und
- (iii) einen Promotor, der spezifisch für Zellen ist, die kritisch für die Pollenbildung oder deren Funktion sind, wobei der Promotor funktionell mit der Nukleotidsequenz, die ein Genprodukt kodiert, verknüpft ist;

(b) optional Züchten der Pflanze, die in Schritt (a) erhalten wurde, unter Bedingungen, die es erlauben, dass männliche Sterilität als Ergebnis der Expression der Nukleotidsequenzen erreicht wird;

(c) Kreuzen der männlich sterilen Pflanze aus (a) oder (b) mit Pollen von einer männlichen fertilen Linie, um eine Hybridpflanze zu erzeugen, die männlich fertil ist, wobei die Pollen ein zweites rekombinantes DNA-Molekül in ihr Genom integriert haben, wobei das zweite rekombinante DNA-Molekül umfasst: eine Nukleotidsequenz, die ein DNA-bindendes Protein kodiert und die Repression der Transkription verursacht, und einen Promotor, der die Expression der Nukleotidsequenz kontrolliert, wobei das DNA-bindende Protein in der Lage ist, den Operator der rekombinanten DNA der männlich sterilen Pflanze zu binden und die Repression der Transkription zu verursachen.

[0089] Ein weiteres System zur Herstellung von pollensterilen Pflanzen, in denen Fremd-DNA ins Kerngenom eingeführt wird und das erfindungsgemäß genutzt werden kann ist in der europäischen Patentanmeldung EP 0 344 029 beschrieben.

[0090] Die vorliegende Erfindung betrifft ferner die Verwendung der erfindungsgemäßen Pflanzen zur Züchtung oder zur Herstellung einer Nachkommenpflanze, wobei der kernkodierte männlich sterile Phänotyp zur rekurrenten Selektion verwendet wird. Zudem betrifft die vorliegende Erfindung neben der erfindungsgemäßen Pflanze auch Samen oder Nachkommen, oder Organ, Pflanzenteil, Gewebe oder Zellen davon in der Herstellung von üblicherweise aus nachwachsenden Rohstoffen gefertigten Produkten wie Nahrungsmittel und Futtermittel, vorzugsweise Zucker oder Sirup (Melasse), wobei die Melasse auch für industrielle Anwendungen genutzt wird, beispielsweise in der Alkoholgewinnung oder als Nährmedium für die Herstellung von biotechnologischen Produkten, in der Herstellung von Werkstoffen oder Stoffen für die chemische Industrie, z. B. Feinchemikalien, Arzneimitteln bzw. Vorstufen davon, Diagnostika, Kosmetika, Bioethanol oder Biogas. Ein Beispiel für die Verwendung von Zuckerrübe als biogener Rohstoff in Biogasanlagen ist in der Anmeldung DE 10 2012 022 178 A1 beschrieben, siehe z. B. Absatz 10.

[0091] Schließlich betrifft die vorliegende Erfindung auch durch die erfindungsgemäßen Pflanzen, Organe, Pflanzenteile, Gewebe, Zellen, Samen und Nachkommen erhältliche Produkte wie Nahrungsmittel, Futtermittel und Werkstoff enthaltend eine erfindungsgemäße Pflanze, Samen, Nachkommen, Organe, Pflanzenteile, Gewebe oder Zellen bzw. Bestandteile davon.

[0092] Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung, ohne jedoch den Gegenstand der Erfindung einzuschränken. Sofern nicht anders angegeben, wurden molekularbiologischen Standardmethoden verwendet, siehe beispielsweise (Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001), Fritsch et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989; Mayer et al., *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology*, eds., Academic Press, London, 1987) und Weir et al., *Handbook Of Experimental Immunology*, Volumes I-IV, Blackwell, eds., 1986).

BEISPIELE

1. Identifizierung eines Locus, der kernkodierte männliche Sterilität verursacht

[0093] Als Ausgangspflanze zur Identifizierung eines Locus, der kernkodierte männliche Sterilität in Zuckerrübe verursacht, wurde ein Donor mit interner Bezeichnung C311 [2043_K5] verwendet, der einen rezessiven, kernkodierten, männlich sterilen Phänotyp (Arbeitsname *gst*) zeigt. Die Anwesenheit und der Zygotiegrad des von diesem Donor stammenden und der Merkmalsausprägung zu Grunde liegenden *gst*-Locus ließen sich im Zuchtmaterial jedoch nicht vorab (also vor der Blüte) prüfen. Vielmehr mussten eine große Anzahl von putativ sterilen Pflanzen im Feld, bzw. Selbstungs-Block (S-Block), zur Blüte gebracht werden. Blühende Pflanzen wurden dann manuell für die Merkmale Fertilität bzw. Sterilität bonitiert (**Abb. 1**). Im Anschluss konnten fertile Individuen entfernt und Saatgut steriler Individuen geerntet werden.

[0094] Zur genetischen und physikalischen Eingrenzung des *gst*-Locus, der die kernkodierte männliche Sterilität verursacht, wurde eine für das Merkmal spaltende Zuckerrüben-Kartierungspopulation erstellt. Aus ersten Vorinformationen einer genomweiten Kartierung war bereits die Zielregion auf Chromosom 1 bekannt. Zur weiteren Feinkartierung wurden männlich sterile Individuen des *gst*-Donors C311 [2043_K5] mit einer annuellen Linie gekreuzt und die resultierenden F1 Individuen wurden durch Selbstbefruchtung vermehrt. Für die Kartierung wurden schließlich Nachkommen der S1 Generation phänotypisiert und durch KASP-DNA Marker (KASP™, SNP Genotyping-Chemie von LGC Limited) charakterisiert. Es wurden 2 KASP-DNA Marker, *sxn2151s01* und *sle3305s02*, entwickelt, wodurch der *gst*-Locus-tragenden Genotyp von dem Referenz-Genotyp KWS2320 durch Identifizierung eines SNPs unterschieden werden kann. Die *sxn2151s01*-Markersequenz dargestellt in SEQ ID Nr. 24 und die *sle3305s02*-Markersequenz dargestellt in SEQ ID Nr. 26 zeigen das Vorhandensein des *gst*-Locus an; die *sxn2151s01*-Markersequenz dargestellt in SEQ ID Nr. 25 und die *sle3305s02*-Markersequenz dargestellt in SEQ ID Nr. 27 zeigen die Referenzsequenz an, wobei sich die Markersequenzen jeweils an Nukleotidposition 21 unterscheiden und ein "G" an dieser Stelle bei dem *gst*-Locus-tragenden Genotyp zu finden ist und ein "A" an dieser Stelle bei dem Referenz-Genotyp KWS2320 zu finden ist. Als Ergebnis dieser Feinkartierung wurde die Region auf Chromosom 1 des Zuckerrüben-genoms stark eingegrenzt, die von den KASP-DNA Markern *sxn2151s01* bei 33,42 cM und *sle3305s02* bei 35,15 cM (basierend auf der genetischen Karte ZR TNT 1202) flankiert wird und den *gst*-Locus trägt. Basierend auf der physikalischen Genomkarte (PhySmapv2) hat diese Region eine physikalische Größe von 215,4 kbp und liegt zwischen den Positionen 3185718 bp und 3401120 bp. Basierend auf der identifizierten Position und der öffentlich erhältlichen Genomannotation RefBeet 1.2 (<http://bvseq.molgen.mpg.de/>) wurden 21 proteinkodierende Gene identifiziert, die in diesem Genomabschnitt lokalisiert sind.

[0095] Zu allen 21 Genmodellen wurden mittels bioinformatischer Ansätze Homologe Gene in Modellpflanzen (z. B. *Arabidopsis thaliana* und *Oryza sativa*) gesucht. Basierend auf den identifizierten Homologen in Modellpflanzen wurde eine umfassende Analyse und Auswertung vorgenommen. Aufgrund dieser umfassenden Analyse von Sequenz und den vorhergesagten Strukturen wurde ein der im *gst*-Lokus kodierten Gene als Mitglied der Familie der Cytochrom P450-Monooxygenasen (CYPs) identifiziert. Trotz beträchtlicher Sequenzdiversität der Cytochrom P450-Monooxygenasen verfügen alle CYPs über gemeinsame strukturelle Merkmale, die besonders im Bereich des aktiven Zentrums hoch konserviert sind (siehe bspw. Fischer et al., *Bioinformatics* 23 (2007), 2015–2017), und die auch für das putative *gst*-Gen gefunden wurden. Daher wurde dieses Gen CYP_{gst} genannt.

[0096] Bei näherer Charakterisierung dieses Gens wurde ein *Arabidopsis thaliana* CYP Gen identifiziert, d. h. CYP703A2, das eine hohe Sequenzidentität zu diesem Gen aus dem *gst*-Lokus aufwies. Eine *Arabidopsis thaliana* Mutante, in der dieses Gen durch Insertion einer T-DNA inaktiviert wurde, zeigt einen partiellen bzw. semi-männlich sterilen Phänotyp (Morant et al. *Plant Cell* 19 (2007), 1473–1487). Mechanistisch erklärt wird dies durch eine Funktion des CYP703A2 in der Synthese des Sporopollenins, dem Hauptbestandteil der Exin-Schicht vitaler Pollen. Eine fehlende Exin-Schicht unterbricht die Reifung der Pollen bzw. macht sehr empfindlich gegen Umwelteinflüsse. Es gibt jedoch zwei wesentlich Unterschiede im Phänotyp des Zuckerrüben *gst*-Phänotyps zum Phänotyp der beschriebenen *Arabidopsis* Mutante:

- (i) im Gegensatz zu *Arabidopsis* erzeugt der knockout des Gens in Zuckerrüben eine vollständige männliche Sterilität und
- (ii) während in *Arabidopsis* Mutanten Pollen grundsätzlich angelegt werden die allerdings steril sind, kommt es nach gegenwärtigem Stand der Analysen in *gst*-Zuckerrüben nicht zur Ausbildung von Pollen.

[0097] Daher ist nicht ausschließen, dass es sich um verschiedene Mitglieder der CYP Familie handelt und/oder die Funktionen beider Proteine in *Arabidopsis* und Zuckerrübe verschieden sind. Hinzu kommt, dass *Arabidopsis* ein Wildkraut aus der Familie der Kreuzblütler mit einem kompakten, kleinen Genom ist während die Zuckerrübe eine Kulturpflanze ist, d. h. eine vom Menschen angebaute, gepflegte und gezüchtete Pflanze, die als Nutzpflanze Verwendung findet. Daher lassen sich Experimente an *Arabidopsis* als Studienobjekt und deren Ergebnisse nicht ohne weiteres auf Kulturpflanzen übertragen. Zudem gibt es auch wichtige, landwirtschaftlich relevante Prozesse in Nutzpflanzen, die in *Arabidopsis* gar nicht vorkommen. Hierzu gehören beispielsweise die Ausbildung von Rübenkörpern, Knollen und Korn, die als Speicherorgan und als vegetatives Vermehrungsorgan dienen, Wechselwirkungen mit symbiontischen Mykorrhizapilzen oder Pathogenen, die nicht mit *Arabidopsis* in Verbindung stehen.

2. Charakterisierung des CYP_{gst} Gens

[0098] Nach der Identifizierung des potenziellen Gens, das den *gst*-Phänotyp verursacht, erfolgte die vergleichende Sequenzierung eines etwa 5 kbp umfassenden Fragments genomischer DNA. Sequenziert wurden der

fertile Zuckerrüben-Referenzgenotyp KWS2320, der sterile *gst*-Donor C311 und jeweils drei nach Phänotypen und Markerdaten als steril und drei als homozygot fertil klassifizierte Individuen der o. g. Feinkartierungspopulation. Die sequenzierte Genomregion umfasste das in **Abb. 2** dargestellte Genmodell von *BvCYP703A2* (*GST*, *g6845.t1*) und zusätzlich etwa 1,5 kbp der putativen Promotorregion. Die vergleichende Sequenzierung offenbarte neben einer Reihe von Small Nucleotide Polymorphisms (SNPs) zwischen sterilen und fertilen Individuen eine 533 bp Deletion in sterilen Genotypen, die die 5'UTR und das erste Exon des Genmodells umfasst (**Abb. 2** und **Abb. 3**).

[0099] Die Analyse aller identifizierten Polymorphismen ergab, dass einzig die Deletion Auswirkungen auf das kodierte Protein hat, während alle anderen Mutationen entweder in untranslatierten Regionen liegen, oder synonyme Codons erzeugen. Die angesprochene Deletion hingegen verhindert eine korrekte Transkription der mRNA und die Translation eines funktionsfähigen Proteins ist damit ausgeschlossen. Im Anschluss durchgeführte Transkriptionsanalysen bestätigen diesen Befund (**Abb. 5**). In fertilen Genotypen wird *BvCYP703A2* (*GST*, *g6845.t1*) sehr spezifisch in geschlossenen Blüten und Früchten exprimiert. In Wurzeln und Blättern ist keine Expression nachweisbar. In sterilen Genotypen hingegen ist keine Expression des *GST*-Gens in geschlossenen Blüten nachweisbar, sodass auf einen vollständigen knockout des Gens in sterilen Genotypen geschlossen werden kann.

[0100] Schließlich wurden DNA Marker entwickelt, die zwischen sterilen und fertilen Genotypen diskriminieren können. Dazu wurden KASP-Marker entwickelt, die dominant das fertile Allel (Insertion) anzeigen (*sle5983d14*, *sle5983d17*).

maName	Primer_forward SEQ ID NO: 4:	Primer_reverse SEQ ID NO: 5:
<i>s1e5983d14</i>	ACCAAAATTTTATACCAATGGCTCAAG	GGCCGGGAGGGAGTTTGTATGTT
	SEQ ID NO: 6:	SEQ ID NO: 7:
<i>s1e5983d17</i>	AGAAATCATACGTGAGATCTTAGTTCG	GGTATGTGGACGAGACGCAATACAT

[0101] Durch diese kann indirekt auf die homozygot vorliegende Deletion geschlossen werden, wenn beide dominanten Marker (*sle5983d14*, *sle5983d17*) ein Nullallel anzeigen und ein dritter, ubiquitärer Marker die hinreichende Qualität der DNA-Extraktion bestätigt. Potentielle Punktmutationen im *BvCYPgst* Gen, die zu einem vorzeitigen Transkriptionsabbruch des *CYPgst* Gens führen beziehungsweise ein gestörtes Splicing verursachen könnten, und auf die mittels üblicher Verfahren zur Detektion von DNA-Punktmutationen (SNP-Analyse) getestet werden kann sind in der nachfolgenden Tabelle 1 zusammengestellt.

Tabelle 1: Potentielle Punktmutationen im *CYPgst* Gen aus *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*, die zu einem vorzeitigen Transkriptionsabbruch des *CYPgst* Gens führen beziehungsweise ein gestörtes Splicing verursachen können.

Position gemäß SEQ ID Nr. 1	Nukleotid	Mutation	Auswirkung der Mutation
1771	G	T	STOP Codon
1778	T	A or G	STOP Codon
1788	T	A or G	STOP Codon
1790	T	A or G	STOP Codon
1797	T	A	STOP Codon
1813	A	T	STOP Codon
1820	T	A or G	STOP Codon
1824	C	A or G	STOP Codon
1825	C	T	STOP Codon

1829	G	A	STOP Codon
1830	G	A	STOP Codon
1834	A	T	STOP Codon
1842	C	A or G	STOP Codon
1844	T	A or G	STOP Codon
1848	C	A or G	STOP Codon
1857	C	A or G	STOP Codon
1858	A	T	STOP Codon
1883	G	A	STOP Codon
1884	G	A	STOP Codon
1889	T	A or G	STOP Codon
1894	G	T	STOP Codon
1906	C	T	STOP Codon
1940	C	A or G	STOP Codon
1947	T	A	STOP Codon
1948	G	T	STOP Codon
1951	A	T	STOP Codon
1956	T	A or G	STOP Codon
1964	T	A or G	STOP Codon
1971	C	A or G	STOP Codon
2014	G	T	STOP Codon
2026	G	T	STOP Codon
2033	T	A or G	STOP Codon
2038	C	T	STOP Codon
2041	C	T	STOP Codon
2075	T	A or G	STOP Codon
2090	T	A	STOP Codon
2097	C	A or G	STOP Codon
2117	T	A	STOP Codon
2128	G	T	STOP Codon
2138	G	A	STOP Codon
2139	G	A	STOP Codon
2140	A	T	STOP Codon
2143	A	T	STOP Codon
2149	A	T	STOP Codon
2160	C	A	STOP Codon
2164	G	T	STOP Codon
2171	T	A	STOP Codon
2182	A	T	STOP Codon
2185	C	T	STOP Codon
2191	G	T	STOP Codon
2218	G	T	STOP Codon
2224	C	T	STOP Codon
2231	T	A	STOP Codon
2236	C	T	STOP Codon
2246	T	A or G	STOP Codon
2260	A	T	STOP Codon

2266	A	T	STOP Codon
2279	T	A	STOP Codon
2284	G	T	STOP Codon
2291	T	A or G	STOP Codon
2320	A	T	STOP Codon
2327	T	A	STOP Codon
2335	A	T	STOP Codon
2338	C	T	STOP Codon
2343	C	A or G	STOP Codon
2368	C	T	STOP Codon
2380	G	T	STOP Codon
2401	G	T	STOP Codon
2405	T	A	STOP Codon
2411	G	A	STOP Codon
2412	G	A	STOP Codon
2414	T	A or G	STOP Codon
2423	T	A	STOP Codon
2430	C	A or G	STOP Codon
2432	T	A	STOP Codon
2442	T	A or G	STOP Codon
2444	T	A	STOP Codon
2453	G	A	STOP Codon
2454	G	A	STOP Codon
2459	G	A	STOP Codon
2460	G	A	STOP Codon
2472	T	A or G	STOP Codon
2473	G	T	STOP Codon
2478	T	A	STOP Codon
2479	G	T	STOP Codon
2482	A	T	STOP Codon
2485	A	T	STOP Codon
2494	G	T	STOP Codon
2500	G	T	STOP Codon
2503	A	T	STOP Codon
2527	A	T	STOP Codon
2536	G	T	STOP Codon
2539	G	T	STOP Codon
2548	A	T	STOP Codon
2551	G	T	STOP Codon
2554	A	T	STOP Codon
2557	A	T	STOP Codon
2563	A	T	STOP Codon
2566	G	T	STOP Codon
2569	G	T	STOP Codon
2575	G	T	STOP Codon
2584	G	T	STOP Codon
2590	G	T	STOP Codon

2612	T	A	STOP Codon
2615	T	A	STOP Codon
2621	T	A	STOP Codon
2629	G	T	STOP Codon
2635	G	T	STOP Codon
2641	G	T	STOP Codon
2665	A	T	STOP Codon
2677	C	T	STOP Codon
2679	G	A	Spleiß-Mutation
2680	G	A	Spleiß-Mutation
2681	T	A	Spleiß-Mutation
3505	A	C or G or T	Spleiß-Mutation
3506	G	A or C or T	Spleiß-Mutation
3535	C	A or G	STOP Codon
3549	G	T	STOP Codon
3553	G	A	STOP Codon
3554	G	A	STOP Codon
3564	G	T	STOP Codon
3573	A	T	STOP Codon
3594	A	T	STOP Codon
3600	C	T	STOP Codon
3603	C	T	STOP Codon
3606	G	T	STOP Codon
3624	G	T	STOP Codon
3633	C	T	STOP Codon
3645	G	T	STOP Codon
3649	C	A or G	STOP Codon
3671	C	A or G	STOP Codon
3680	T	A	STOP Codon
3690	G	T	STOP Codon
3699	C	T	STOP Codon
3724	T	A or G	STOP Codon
3735	G	T	STOP Codon
3739	C	A or G	STOP Codon
3767	T	A or G	STOP Codon
3811	T	A or G	STOP Codon
3813	G	T	STOP Codon
3825	A	T	STOP Codon
3832	G	A	STOP Codon
3833	G	A	STOP Codon
3843	G	T	STOP Codon
3854	C	A or G	STOP Codon
3858	G	T	STOP Codon
3861	A	T	STOP Codon
3868	G	A	STOP Codon
3869	G	A	STOP Codon
3874	T	A	STOP Codon

3879	G	T	STOP Codon
3885	A	T	STOP Codon
3891	G	T	STOP Codon
3903	G	T	STOP Codon
3915	A	T	STOP Codon
3922	T	A or G	STOP Codon
3939	A	T	STOP Codon
3942	A	T	STOP Codon
3945	A	T	STOP Codon
3950	T	A	STOP Codon
3982	T	A	STOP Codon
3987	G	T	STOP Codon
3991	T	A	STOP Codon
4018	G	A	STOP Codon
4019	G	A	STOP Codon
4021	T	A or G	STOP Codon
4032	G	T	STOP Codon
4038	A	T	STOP Codon
4044	G	T	STOP Codon
4047	G	T	STOP Codon
4059	A	T	STOP Codon
4062	G	T	STOP Codon
4070	T	A or G	STOP Codon
4086	A	T	STOP Codon
4092	C	T	STOP Codon
4099	T	A or G	STOP Codon
4108	T	A	STOP Codon
4113	A	T	STOP Codon
4132	T	A or G	STOP Codon
4136	T	A or G	STOP Codon

3. Verwendung des CYPgst Gens bzw. -Lokus in der Hybridzüchtung

[0102] Wie bereits vorstehend beschrieben, wird der männlich sterile Phänotyp, den der *gst*-Locus hervorruft, in Resistenzzuchtprogrammen zum einfachen Durchkreuzen im Rahmen der rekurrenten Selektion eingesetzt. Vor der Klonierung des Gens im Rahmen der vorliegenden Erfindung und der damit verbundenen Entwicklung von genomischen Markern mussten wegen der erwarteten phänotypischen 3:1 Spaltung viermal mehr Pflanzen angezogen und ausgebracht werden, als benötigt. Diese Pflanzen mussten bei einsetzender Blüte innerhalb kurzer Zeit auf Sterilität bonitiert werden und fertile Individuen mussten entfernt werden, um Selbstbestäubungen zu vermeiden. Legt man mehrere tausend Pflanzen pro Jahr zu Grunde, ist diese manuelle Selektion sehr arbeitsaufwändig und auch fehleranfällig. Nunmehr werden erfindungsgemäß genomische Marker bereitgestellt, siehe Beispiel 2 und **Abb. 2** mit denen es beispielsweise möglich war, 30.000 Pflanzen zu testen und 7.500 männlich sterile Individuen zu selektieren, die anschließend gepflanzt wurden.

[0103] Es gibt ein beständiges Bemühen, Zuchtprogramme und Saatgutproduktion für Zuckerrüben zu vereinfachen und damit Kosten zu sparen. So werden kommerzielle Zuckerrüben gegenwärtig als Dreifach-Hybride erzeugt, um Saatgut von ausreichend hoher Qualität zu produzieren. Die Produktion von Hybriden in den Zuchtprogrammen, also im nicht-kommerziellen Bereich, ist ebenfalls kosten- und arbeitsintensiv und wird gegenwärtig durch Aufstellen von Trennwänden gewährleistet. Mit Hilfe des erfindungsgemäßen *gst*-Phänotyps und zugehörigen DNA Markern ist es nunmehr möglich – nach Einbringen des *gst*-Locus bzw. Mutation/Inhibierung des CYPgst Gens in die Zuchtprogramme –, männlich sterile Pflanzen vor dem Auspflanzen durch DNA-Marker zu selektieren und die Produktionsabläufe damit zu vereinfachen. Die parallele Entwicklung von multigermen Tester-Genotypen (MUS-Tester) würde sich damit ebenfalls erübrigen. Langfristig ist es ebenfalls denkbar, ge-

genwärtig verwendete CMS Technologie durch ein alternatives System mit dem die Samenerler-Komponente in einen männlich sterilen Zustand versetzt werden kann, beispielweise mittels dem vorstehend erwähnten und in **Abb. 5** gezeigten SPT-System, zu ersetzen. Dementsprechend ist es auch angemessen anzunehmen, das erfindungsgemäße CYPgst System in anderen Kultur-, insbesondere Nutzpflanzen Anwendung findet wie in der kommerziellen Produktion von Zweifachhybriden, wie im Mais. Im Mais (*Zea mays*) spielen ms-Gene eine große Rolle für die Entwicklung alternativer Systeme zur Herstellung von Hybridsaatgut. Sequenzanalysen ergaben, dass ein putatives Mais-Homolog zu BvCYPgst existiert (GRMZM5g830329). Ebenso existiert eine große Anzahl von ms-Mutanten in Mais, von denen bislang nur ein Teil kloniert wurde. Mittels der vorliegenden Erfindung können nun die ms-Mutanten isoliert werden, der ms-Phänotyp auf eine Mutation bzw. Inhibierung des Mais-Homolog zu BvCYPgst zurückzuführen ist und gezielt in der Saatgutproduktion eingesetzt werden. Ebenso findet die vorliegende Erfindung Einsatz in der Entwicklung einer Hybridkartoffel, beispielsweise um gezielt Mutationen in dem Kartoffelhomolog des BvCYPgst Gens einzuführen und die so erworbene männliche Sterilität in der Kartoffel zu nutzen, um im Sinne des SPT-System eine diploide Hybridkartoffel zu entwickeln.

[0104] Schließlich ermöglicht die spezifische Expression des Gens BvCYPgst in Blüten und dem Tapetum eine biotechnologische Nutzung des Promotors, beispielsweise zur Expression einer Sense-/Antisense-RNA oder eines Ribozyms zur Inhibierung des BvCYPgst Gens oder zur Expression eines funktionellen CYPgst Proteins bzw. eines putativen Homolog, Analog oder Ortholog des BvCYPgst Gens zur Komplementation der Mutation und Restauration des männlich fertilen Phänotyps. Es wird davon ausgegangen, dass die Bereitstellung des Genlocus und der Nuklein- und Aminosäuresequenzen des BvCYPgst Gens nebst der genetischen Marker und die sich davon ableitenden Ausführungsformen eine wesentliche Vereinfachung und Kostenersparnis seitens der Zuchtprogramme mit sich bringt, da u. a. bereits eine frühzeitige Selektion steriler Individuen ermöglicht wird. Ebenso lässt sich damit eine logistische Vereinfachung und züchterische Erweiterung der beteiligten Programme erreichen.

Es folgt ein Sequenzprotokoll nach WIPO St. 25. Dieses kann von der amtlichen Veröffentlichungsplattform des DPMA heruntergeladen werden.

ZITATE ENTHALTEN IN DER BESCHREIBUNG

Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde automatisiert erzeugt und ist ausschließlich zur besseren Information des Lesers aufgenommen. Die Liste ist nicht Bestandteil der deutschen Patent- bzw. Gebrauchsmusteranmeldung. Das DPMA übernimmt keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.

Zitierte Patentliteratur

- WO 1996/017945 [0034]
- WO 00/75359 [0068, 0071]
- US 2006288440 A1 [0072]
- WO 99/023232 [0079]
- WO 2004/074492 [0079]
- WO 2000/018939 [0079]
- WO 2013/138309 [0079]
- WO 2014/144155 A1 [0081]
- DE 102013101617 [0081, 0081]
- WO 2001/012824 [0082]
- WO 96/017945 [0088]
- EP 0344029 [0089]
- DE 102012022178 A1 [0090]

Zitierte Nicht-Patentliteratur

- Morant et al., The Plant Cell, 19 (2007), 1473–1487 [0010]
- Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001 [0014]
- An Introduction to Genetic Analysis. 7th Edition, Griffiths, Miller, Suzuki et al., 2000 [0016]
- Napoli et al., Plant Physiology 120 (1999), 615–622 [0034]
- Jeong et al., J. Exp. Bot. 65 (2014), 6693–6709 [0034]
- Morant et al., The Plant Cell, 19 (2007), 1473–1487 [0035]
- Morant et al. (2007) [0036]
- Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001 [0049]
- "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays," Elsevier, New York (1993); und in Current Protocols in Molecular Biology, Kapitel 2, Ausubel, et al., eds, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1995) [0062]
- Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001 oder Wingfield, P. T. 2008 [0066]
- E. Harlow et al., Herausgeber Antibodies: A Laboratory Manual (1988) [0066]
- Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, S. 98–118, New York: Academic Press (1983) [0066]
- Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 oder Ausubel et al., 1994, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons [0066]
- Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001 [0092]
- Fritsch et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989 [0092]
- Mayer et al., Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology, eds., Academic Press, London, 1987 [0092]
- Weir et al., Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I–IV, Blackwell, eds., 1986 [0092]
- <http://bvseq.molgen.mpg.de/> [0094]
- Fischer et al., Bioinformatics 23 (2007), 2015–2017 [0095]
- Morant et al. Plant Cell 19 (2007), 1473–1487 [0096]

Patentansprüche

1. Nukleinsäuremolekül oder rekombinantes DNA-Molekül, das eine Nukleotidsequenz umfasst, vorzugsweise wobei das rekombinante DNA-Molekül (i) einen Promotor mit einer Nukleotidsequenz gemäß (f) umfasst, der mit einem heterologen Nukleinsäuremolekül operativ verknüpft ist, oder (ii) eine kodierende Nukleotidsequenz gemäß (a)–(e) umfasst, die operativ mit einem heterologen Promoter verknüpft ist, der vorzugsweise in der Lage ist, die Expression der Nukleotidsequenz spezifisch in geschlossenen Blüten und/oder Früchten zu steuern, wobei die Nukleotidsequenz ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einer:

- (a) Nukleotidsequenz, die die in SEQ ID Nr.: 1 oder SEQ ID Nr.: 2 gezeigte Nukleotidsequenz oder ein funktionelles Fragment davon aufweist;
- (b) Nukleotidsequenz, die die in SEQ ID Nr.: 3 gezeigte Aminosäuresequenz kodiert; (c) Nukleotidsequenz, die in der Lage ist, an eine Nukleotidsequenz komplementär zu einer Nukleotidsequenz gemäß (a) oder (b) unter stringenten Bedingungen zu hybridisieren;
- (d) Nukleotidsequenz, die eine Aminosäuresequenz kodiert, die gegenüber der Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID Nr.: 3 Abweichungen in Form von Aminosäure-Deletionen, Substitutionen, Additionen und/oder Insertionen in der Aminosäuresequenz, und vorzugsweise eine Sequenzidentität von mindestens 60% über die gesamte Aminosäuresequenz aufweist;
- (e) Nukleotidsequenz, die ein Protein mit der gleichen enzymatischen Aktivität kodiert, wie das Protein, das durch eine Nukleotidsequenz nach einem aus (a) bis (d) kodiert wird; und
- (f) Nukleotidsequenz, die mindestens 200 oder 400, bevorzugt mindestens 600 oder 800, besonders bevorzugt mindestens 1000 konsekutive Nukleotide aus dem Promotor der Nukleinsäuresequenz von SEQ ID Nr.: 1 von Nukleotidpositionen 1 bis 1518, bevorzugt von Nukleotidpositionen 518 bis 1518, besonders bevorzugt von Nukleotidpositionen 1318 bis 1518 oder eine Sequenz, die an diesen Bereich hybridisiert, umfasst, wobei die Nukleotidsequenz in der Lage ist, die Expression des Gens bzw. eines heterologen Nukleinsäuremoleküls, das operativ mit der Nukleotidsequenz verknüpft ist spezifisch in geschlossenen Blüten und/oder Früchten zu steuern.

2. Rekombinantes DNA-Molekül umfassend eine Nukleotidsequenz, die eine shRNA (small hairpin RNA), siRNA (small interfering RNA), Antisense-RNA, Sense-RNA oder doppelsträngige RNA kodiert, die nach Expression in einer Pflanzenzelle oder nach Einbringen in eine Pflanzenzelle zur Inhibierung der Expression des funktionellen (nicht-mutierten) CYPgst Gens führt.

3. Nukleinsäuremolekül, das eine Nukleotidsequenz mit einer Mutation in Form einer Deletion, Addition, Insertion oder Substitution umfasst, wobei diese Mutation dazu führt, dass kein funktionelles CYPgst Protein synthetisiert wird, wobei die Nukleotidsequenz ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einer:

- (a) Nukleotidsequenz, die die in SEQ ID Nr.: 1 oder SEQ ID Nr.: 2 gezeigte Nukleotidsequenz oder ein funktionelles Fragment davon aufweist;
- (b) Nukleotidsequenz, die die in SEQ ID Nr.: 3 gezeigte Aminosäuresequenz kodiert;
- (c) Nukleotidsequenz, die in der Lage ist, an eine Nukleotidsequenz komplementär zu einer Nukleotidsequenz gemäß (a) oder (b) unter stringenten Bedingungen zu hybridisieren;
- (d) Nukleotidsequenz, die eine Aminosäuresequenz kodiert, die gegenüber der Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID Nr.: 3 Abweichungen in Form von Aminosäure-Deletionen, Substitutionen, Additionen und/oder Insertionen in der Aminosäuresequenz, und vorzugsweise eine Sequenzidentität von mindestens 60% über die gesamte Aminosäuresequenz aufweist;
- (e) Nukleotidsequenz, die ein Protein mit der gleichen enzymatischen Aktivität kodiert, wie das Protein, das durch eine Nukleotidsequenz nach einem aus (a) bis (d) kodiert wird; und
- (f) Nukleotidsequenz, die mindestens 200 oder 400, bevorzugt mindestens 600 oder 800, besonders bevorzugt mindestens 1000 konsekutive Nukleotide aus dem Promotor der Nukleinsäuresequenz von SEQ ID Nr.: 1 von Nukleotidpositionen 1 bis 1518, bevorzugt von Nukleotidpositionen 518 bis 1518, besonders bevorzugt von Nukleotidpositionen 1318 bis 1518 oder eine Sequenz, die an diesen Bereich hybridisiert, umfasst, wobei die Nukleotidsequenz in der Lage ist, die Expression des Gens bzw. eines heterologen Nukleinsäuremoleküls, das operativ mit der Nukleotidsequenz verknüpft ist spezifisch in geschlossenen Blüten und/oder Früchten zu steuern.

4. Nukleinsäuremolekül von mindestens 15, 16, 17, 18, 19 oder 20, bevorzugt mindestens 21, 22, 23, 24 oder 25, besonders bevorzugt mindestens 30, 35, 40, 45 oder 50, und ganz besonders bevorzugt mindestens 100, 200, 300, 500 oder 1000 Nukleotiden Länge, das spezifisch an eine wie in Anspruch 1 definierte Nukleotidsequenz hybridisiert, vorzugsweise in Form eines Oligonukleotids, vorzugsweise mit einer Länge von maximal 50 Nukleotiden, das vorzugsweise eine der folgenden Nukleotidsequenzen aufweist:

- (i) SEQ ID Nr.: 4, 6 oder einem Komplement davon, oder

(ii) SEQ ID Nr.: 5, 7 oder einem Komplement davon.

5. Vektor, vorzugsweise Pflanzenvektor umfassend ein DNA-Molekül bzw. Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 3 oder ein Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 4, vorzugsweise wobei das DNA-Molekül bzw. Nukleinsäuremolekül als Transgen in der Lage ist ein funktionelles CYPgst zu exprimieren und vorzugsweise genetisch gekoppelt ist mit einem weiteren Transgen, welches die Weitergabe des DNA-Moleküls bzw. Nukleinsäuremoleküls über den Pollen verhindert, vorzugsweise wobei der Vektor bzw. das Transgen des Weiteren eine Expressionskassette aufweist, die zur einer Markierung der Samen führt, vorzugsweise durch Fluoreszenz-Markierung.

6. Wirtszelle, vorzugsweise Pflanzenzelle enthaltend ein rekombinantes DNA-Molekül bzw. Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 3, oder einen Vektor nach Anspruch 5.

7. Kit umfassend ein DNA-Molekül bzw. Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 3, Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 4, Oligonukleotid wie in Anspruch 4 definiert, Vektor nach Anspruch 5, CYPgst Protein, das von einer wie in Anspruch 1 definierten DNA-Sequenz kodiert wird oder ein funktionelles und/oder immunologisch aktives Fragment davon und/oder Antikörper der spezifisch an das CYPgst Protein oder Fragment bindet, und gegebenenfalls Reagenzien für nukleinsäurebasierende oder immunologische Nachweisverfahren.

8. Verfahren zur Herstellung einer Pflanze, insbesondere Nutzpflanze, die einen rezessiven, kernkodierten, im homozygoten Zustand männlich sterilen Phänotyp zeigt, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Expression des CYPgst Gens inhibiert wird, vorzugsweise **dadurch gekennzeichnet**, dass das Verfahren einen Schritt des Einbringens des rekombinanten DNA-Moleküls nach Anspruch 2, des Nukleinsäuremoleküls nach Anspruch 3 oder 4 oder des Vektors nach Anspruch 5 beispielsweise mittels Agrobacterium-Transformation oder T-DNA-Tagging, infolgedessen die Expression des Gens beispielsweise durch RNAi oder Co-Suppression inhibiert wird.

9. Verfahren zur Restauration der Fertilität einer Pflanze umfassend das Einbringen eines funktionellen CYPgst Gens in die Pflanze, vorzugsweise wobei das CYPgst Gen mittels einer rekombinanten DNA nach Anspruch 6 oder eines Vektors nach Anspruch 10 eingebracht wird oder durch Kreuzung einer Pflanze, die das CYPgst Wildtypgen oder ein funktionelles CYPgst Gen, vorzugsweise im homozygoten Zustand trägt, wobei die Pflanze eine Pflanze, insbesondere Nutzpflanze, die einen rezessiven, kernkodierten männlich sterilen Phänotyp zeigt, ist und dadurch gekennzeichnet ist, dass der Phänotyp mit einer Mutation, welche von dem endogenen Cytochrom P450 Oxidase (CYPgst) Gen umfasst wird, oder mit der Abwesenheit bzw. im Vergleich zu einer entsprechenden (männlich fertilen) Wildtyppflanze geringen Gehalt bzw. Aktivität eines funktionsfähigen CYPgst Proteins, das durch das Wildtypgen von CYPgst kodiert wird, korreliert, und es sich bei dem nicht-mutierten CYPgst Gen um ein Gen handelt ausgewählt aus:

(a) BvCYPgst aus *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*, das vorzugsweise eine der in SEQ ID Nr.: 1 oder 2 gezeigte Nukleotidsequenz umfasst bzw. die in SEQ ID Nr.: 3 gezeigte Aminosäuresequenz kodiert, oder um dessen Homolog, Analog oder Ortholog;

(b) StCYPgst aus *Solanum tuberosum*, das vorzugsweise eine der in SEQ ID Nr.: 12 oder 13 gezeigte Nukleotidsequenz umfasst bzw. die in SEQ ID Nr.: 14 gezeigte Aminosäuresequenz kodiert, oder um dessen Homolog, Analog oder Ortholog; oder

(c) ZmCYPgst aus *Zea mays*, das vorzugsweise eine der in SEQ ID Nr.: 9 oder 10 gezeigte Nukleotidsequenz umfasst bzw. die in SEQ ID Nr.: 11 gezeigte Aminosäuresequenz kodiert, oder um dessen Homolog, Analog oder Ortholog; oder eine Pflanze erhältlich durch ein Verfahren nach Anspruch 8 ist.

10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei die Pflanze heterozygot für die Mutation und männlich fertil oder homozygot für die Mutation und männlich steril ist, wobei in der sterilen Pflanze die Ausbildung von funktionellem Pollen unterbunden ist.

11. Verfahren nach Anspruch 9 oder 10, wobei die Mutation die Transkription und/oder Translation eines funktionellen Proteins verhindert, vorzugsweise wobei es sich bei der Mutation um eine Deletion, Addition, Insertion oder Substitution in der kodierenden Nukleotidsequenz des CYPgst Gens, in einem Splicing-Signal oder in einer regulatorischen Sequenz, vorzugsweise der Promotorsequenz, des CYPgst Gen handelt, wobei vorzugsweise in *Beta vulgaris* die Deletion durch Abwesenheit einer oder beider der Markerloci *sle5983d14* (Amplifikationsprodukt der Primer mit SEQ ID Nr.: 4 und 5) und *sle5983d17* (Amplifikationsprodukt der Primer mit SEQ ID Nr.: 6 und 7) und durch Anwesenheit eines ubiquitären Markers nachgewiesen werden kann, vorzugsweise wobei das Gen in einem Segment auf Chromosom 1 zwischen den Markerloci *sxn2151s01*

und sle3305s02 lokalisiert ist, wobei die sxn2151s01-Markersequenz dargestellt in SEQ ID Nr. 24 und die sle3305s02-Markersequenz dargestellt in SEQ ID Nr. 26 das Vorhandensein des *gst*-Locus anzeigen und die sxn2151s01-Markersequenz dargestellt in SEQ ID Nr. 25 und die sle3305s02-Markersequenz dargestellt in SEQ ID Nr. 27 die Referenzsequenz anzeigen.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 11, wobei das nicht-mutierten Gen (Wildtypgen) eine Nukleotidsequenz aufweist, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus einer:

- (a) Nukleotidsequenz, die die in SEQ ID Nr.: 1 oder SEQ ID Nr.: 2 gezeigte Nukleotidsequenz oder ein funktionelles Fragment davon aufweist;
- (b) Nukleotidsequenz, die die in SEQ ID Nr.: 3 gezeigte Aminosäuresequenz kodiert;
- (c) Nukleotidsequenz, die in der Lage ist, an eine Nukleotidsequenz komplementär zu einer Nukleotidsequenz gemäß (a) oder (b) unter stringenten Bedingungen zu hybridisieren;
- (d) Nukleotidsequenz, die eine Aminosäuresequenz kodiert, die gegenüber der Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID Nr.: 3 Abweichungen in Form von Aminosäure-Deletionen, Substitutionen, Additionen und/oder Insertionen in der Aminosäuresequenz, und vorzugsweise eine Sequenzidentität von mindestens 60% über die gesamte Aminosäuresequenz aufweist;
- (e) Nukleotidsequenz, die ein Protein mit der gleichen enzymatischen Aktivität kodiert, wie das Protein, das durch eine Nukleotidsequenz nach einem aus (a) bis (d) kodiert wird; und
- (f) Nukleotidsequenz, die mindestens 200 oder 400, bevorzugt mindestens 600 oder 800, besonders bevorzugt mindestens 1000 konsekutive Nukleotide aus dem Promotor der Nukleinsäuresequenz von SEQ ID Nr.: 1 von Nukleotidpositionen 1 bis 1518, bevorzugt von Nukleotidpositionen 518 bis 1518, besonders bevorzugt von Nukleotidpositionen 1318 bis 1518 oder eine Sequenz, die an diesen Bereich hybridisiert, umfasst, wobei die Nukleotidsequenz in der Lage ist, die Expression des Gens bzw. eines heterologen Nukleinsäuremoleküls, das operativ mit der Nukleotidsequenz verknüpft ist spezifisch in geschlossenen Blüten und/oder Früchten zu steuern.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 12, wobei die Pflanze eine Inzuchtpflanze oder eine Hybridpflanze ist, vorzugsweise eine Pflanze der Gattung *Zea*, *Solanum*, *Triticum*, *Triticale*, *Helianthus*, *Secale*, *Hordeum*, *Brassica*, *Brachypodium*, *Glycine*, *Gossypium*, *Sorghum*, *Saccharum*, *Setaria*, *Aegilops*, *Oryza*, *Daucus*, *Eucalyptus*, *Erythranthe*, *Genlisea*, *Musa*, *Avena*, *Nicotiana*, *Coffea*, *Vitis*, *Cucumis*, *Morus*, *Crucihimalaya*, *Cardamine*, *Lepidium*, *Capsella*, *Olmarabidopsis*, *Arabis*, *Raphanus*, *Eruca*, *Citrus*, *Jatropha*, *Populus* oder *Beta* ist, vorzugsweise eine Pflanze der Art *Zea mays*, *Solanum tuberosum*, *Triticum aestivum*, *Triticum durum*, *Triticum spelta*, *Helianthus annuus*, *Secale cereale*, *Hordeum vulgare*, *Hordeum bulbosum*, *Brassica napus*, *Brassica oleracea*, *Brassica rapa*, *Brassica juncea*, *Brassica nigra*, *Glycine max*, *Gossypium sp.*, *Sorghum bicolor*, *Triticale*, *Saccharum officinarum*, *Setaria italica*, *Oryza sativa*, *Oryza minuta*, *Oryza australiensis*, *Oryza alta*, *Brachypodium distachyon*, *Hordeum marinum*, *Aegilops tauschii*, *Daucus glochidiatus*, *Daucus pusillus*, *Daucus muricatus*, *Daucus carota*, *Eucalyptus grandis*, *Erythranthe guttata*, *Genlisea aurea*, *Musa sp.*, *Avena sp.*, *Nicotiana sylvestris*, *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana tomentosiformis*, *Solanum lycopersicum*, *Coffea canephora*, *Vitis vinifera*, *Cucumis sativus*, *Morus notabilis*, *Crucihimalaya himalaica*, *Crucihimalaya wallichii*, *Cardamine flexuosa*, *Lepidium virginicum*, *Capsella bursa-pastoris*, *Olmarabidopsis pumila*, *Arabis hirsuta*, *Raphanus sativus*, *Eruca vesicaria sativa*, *Citrus sinensis*, *Jatropha curcas*, *Populus trichocarpa* oder *Beta vulgaris*.

14. Pflanze enthaltend Pflanzenzellen nach Anspruch 6 und/oder erhältlich durch ein Verfahren nach Anspruch 8 oder 9.

15. Organ, Pflanzenteil, Gewebe oder Zelle der Pflanze nach Anspruch 14 oder Samen oder Nachkommen der Pflanze nach Anspruch 14, wobei der Samen oder die Nachkommen ein rekombinantes DNA-Molekül bzw. Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 3 oder einen Vektor nach Anspruch 5 aufweist.

16. Verfahren zur Identifizierung einer Pflanze nach Anspruch 14 durch Nachweis einer Mutation in dem CYPgst Gen bzw. eines Markers, der mit der Mutation gekoppelt ist.

17. Verwendung eines DNA-Moleküls bzw. Nukleinsäuremoleküls nach einem der Ansprüche 1 bis 3, Nukleinsäuremoleküls nach Anspruch 4, Oligonukleotids wie in Anspruch 4 definiert, Vektors nach Anspruch 5 und/oder Kits nach Anspruch 7 zur Identifizierung einer Pflanze nach Anspruch 14, in der Herstellung einer

rezessiven, kernkodierten, männlich sterilen Pflanze, in der Herstellung einer Pflanze mit restaurierter Fertilität, in der Herstellung einer Hybridpflanze, in Resistenzzuchtprogrammen, oder zur Saatgutproduktion.

Es folgen 13 Seiten Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

fertil

steril

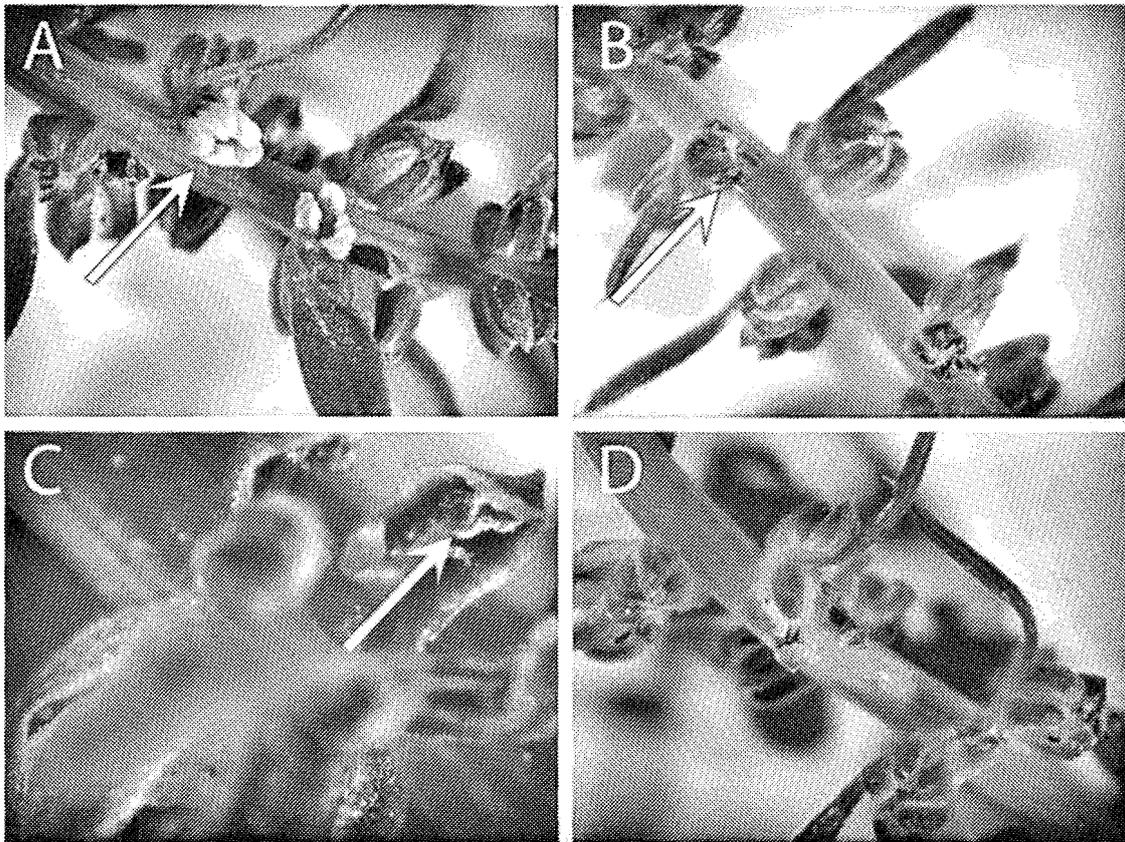


Abb. 1

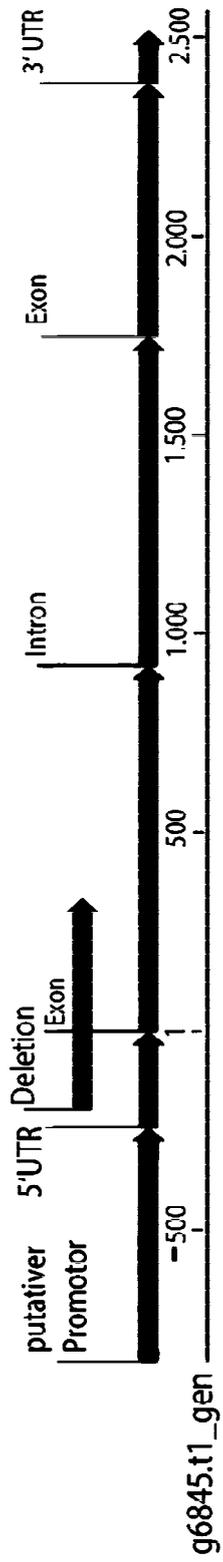


Abb. 2

Consensus_Fertili	TTTGTATACA	TATATATTGT	CTTTACATAG	CARAACAATA	TTGAAGGTAT	TTGAAGGTAT	AACAACCTTT	CCCTTTTCTT	TTACTACATG	TTTATGTTAG	990
Consensus_Sterili	TTTGTATACA	TATATATTGT	CTTTACATAG	CARAACAATA	TTGAAGGTAT	TTGAAGGTAT	AACAACCTTT	CCCTTTTCTT	TTACTACATG	TTTATGTTAG	990
Consensus_Fertili	AGTTTTTCGA	TTTACGATTG	TGGTAAATTA	ATTGTAATTG	ATCGGTTGTC	TTGTAGTCAA	GAATGACGT	ATGAATCAAT	TTAGGGCATG	1080	
Consensus_Sterili	AGTTTTTCGA	TTTACGATTG	TGGTAAATTA	ATTGTAATTG	ATCGGTTGTC	TTGTAGTCAA	GAATGACGT	ATGAATCAAT	TTAGGGCATG	1080	
Consensus_Fertili	TTCTCTTCGG	CATAAACAG	CTGAACCTGAA	TTGAACCTGAA	CTGAAATGAA	TAGTGATATG	TGAGAGTAAA	AGTATTGTCA	AGAGCTGAAC	1170	
Consensus_Sterili	TTCTCTTCGG	CATAAACAG	CTGAACCTGAA	TTGAACCTGAA	CTGAAATGAA	TAGTGATATG	TGAGAGTAAA	AGTATTGTCA	AGAGCTGAAC	1170	
Consensus_Fertili	TGAGCTGAAC	TGAACGGATC	TGAACCTGAAC	TGATCTAATC	TGAACCTAATC	TGAACCTGAAC	TGAACCTGAAT	TGAACCTGAAA	ATAAGCTAGG	1260	
Consensus_Sterili	TGAGCTGAAC	TGAACGGATC	TGAACCTGAAC	TGATCTAATC	TGAACCTAATC	TGAACCTGAAC	TGAACCTGAAT	TGAACCTGAAA	ATAAGCTAGG	1260	
Consensus_Fertili	GAAAACAGAC	CCTTACTACT	ATTATATAAC	CTCGTTTAAA	TATTAGGAAA	TTAAAAAAT	AATTATATT	CTTTTACTT	TATTAACTA	1350	
Consensus_Sterili	GAAAACAGAC	CCTTACTACT	ATTATATAAC	CTCGTTTAAA	TATTAGGAAA	TTAAAAAAT	AATTATATT	CTTTTACTT	TATTAACTA	1350	
Consensus_Fertili	TTGAGGTTTT	TATATTGACT	GGCAATAGT	ATTTTATAGA	TCATGGCATG	TTAATGAGCA	AACTACTTTC	TCACATGTTT	ATAGGAGAAA	1440	
Consensus_Sterili	TTA.....	1353	
Consensus_Fertili	AAGTAGATCA	CTCACTAGCA	TATCATGACC	AGGAAACCA	ACCAAGGCTA	ATAGTTTTAT	TGGTTCCATT	AGAGATAAGA	GTTAACTAAT	1530	
Consensus_Sterili	1353	
Consensus_Fertili	AATACCATCT	TTGTGAATT	TTGATGGATT	TTGGAAGTTT	AGCAATATAT	TTACTGTGTG	CACTTTTTGG	TACCAAAATT	TTATACCAAT	1620	
Consensus_Sterili	1353	
Consensus_Fertili	GGCICAGTIC	CTACTTATAC	ACAACATACA	AACTCCCTCC	CGGGCCACCA	AGGTGGCCCT	TATTGGAAA	CCCTCCTTCAA	CTAGGGCCAC	1710	
Consensus_Sterili	1353	
Consensus_Fertili	TTCCCCAGCG	CGATTTTGGC	TCATTTTGTG	AAAAATATGG	GCCTTTAGTC	TACATAAGGC	TTGGTAATGT	GGATGGCATA	ACCACATAATG	1800	
Consensus_Sterili	1353	

Abb. 3 (fortwährend)

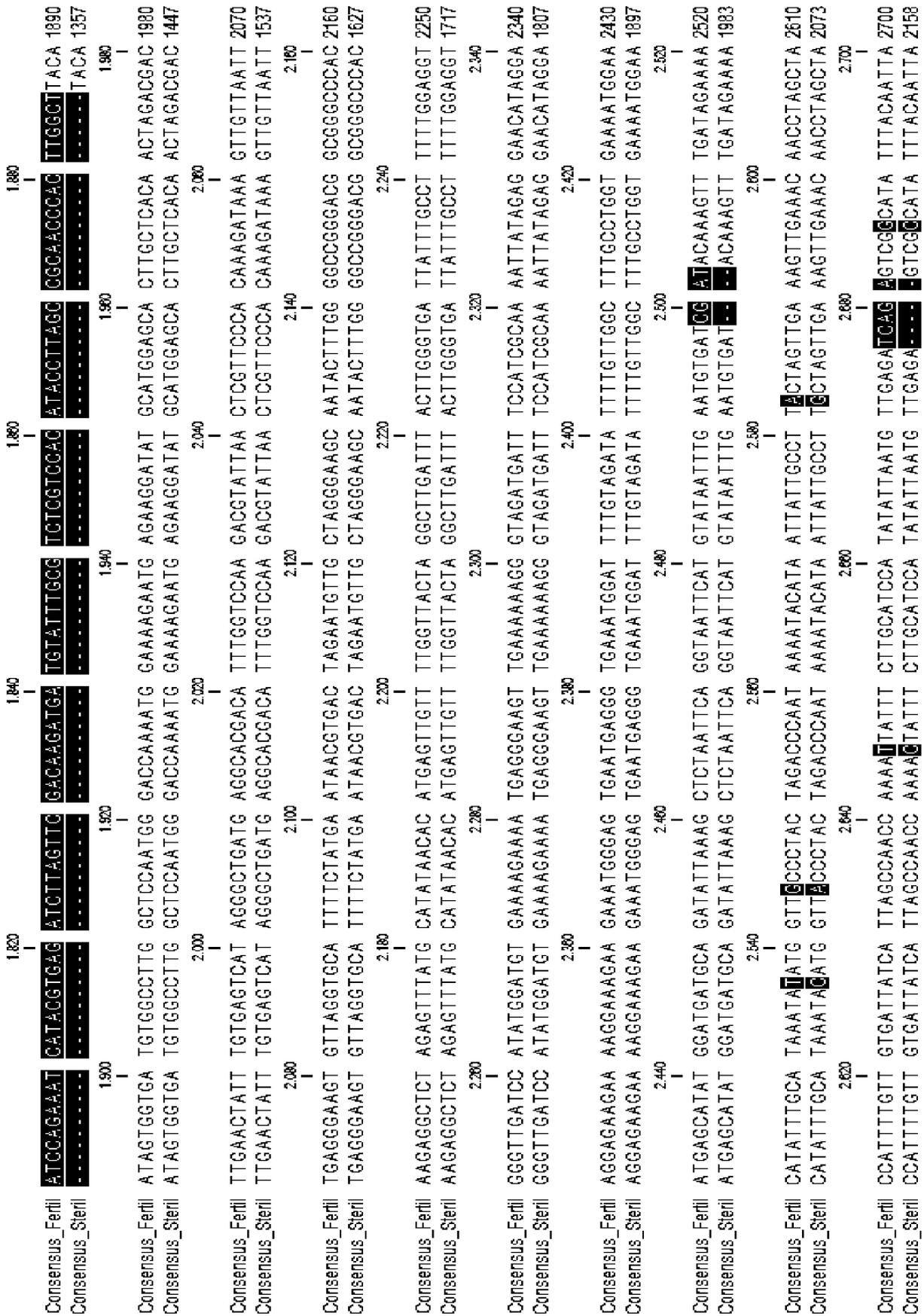


Abb. 3 (fortwährend)

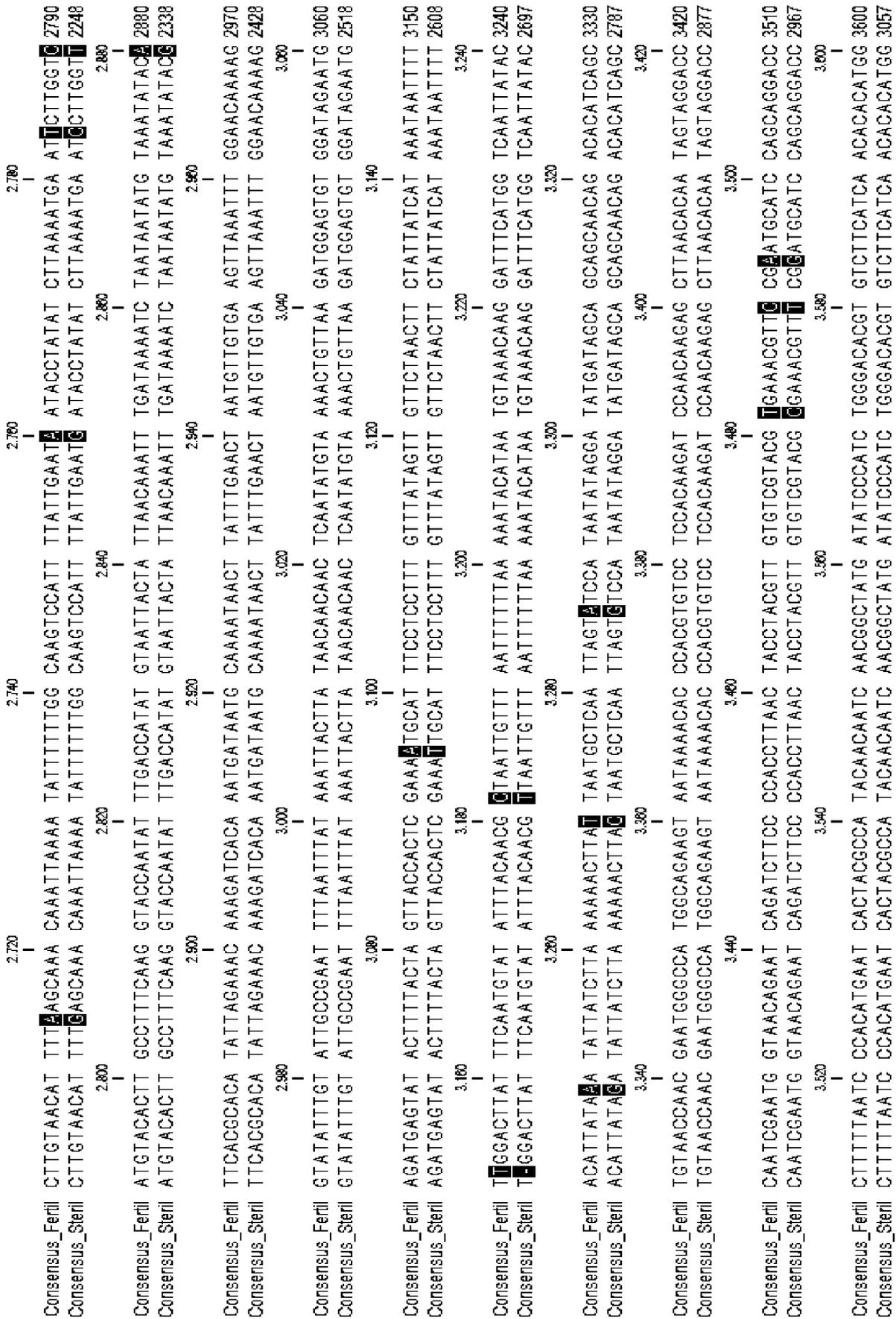


Abb. 3 (fortwährend)

Consensus_Fertil 3.620 | 3.640 | 3.660 | 3.680
 GTTAGGACGT AACCTTAAAG TGTGGACAA CATAGAGGAT TTTTACCCTG AAAGACATTG GCCGTTGGAT GGAAGTAGAG TTGAGATTAG 3690
 Consensus_Steril 3.700 | 3.720 | 3.740 | 3.760 | 3.780
 GTTAGGACGT AACCTTAAAG TGTGGACAA CATAGAGGAT TTTTACCCTG AAAGACATTG GCCGTTGGAT GGAAGTAGAG TTGAGATTAG 3147

 Consensus_Fertil 3.800 | 3.820 | 3.840 | 3.860
 CCATGGATCT GATTTTAAAA TATTACCATT TAGTCTGGG AAGAGAAGAT GTCCTGGGG CCCACTTGGG GTGGTGTGG TGTGATGGG 3780
 Consensus_Steril 3.880 | 3.900 | 3.920 | 3.940 | 3.960
 CCATGGATCT GATTTTAAAA TATTACCATT TAGTCTGGG AAGAGAAGAT GTCCTGGGG CCCACTTGGG GTGGTGTGG TGTGATGGG 3237

 Consensus_Fertil 3.980 | 4.000 | 4.020 | 4.040
 ATGGCTACA CTTTTTCATG CATTGATGG GTTACCACCT GATGGAATGA AGGCAGAAGA AATTGATACT AAGGAAGTTT ATGGGATGAC 3870
 Consensus_Steril 4.060 | 4.080 | 4.100 | 4.120
 ATGGCTACA CTTTTTCATG CATTGATGG GTTACCACCT GATGGAATGA AGGCAGAAGA AATTGATACT AAGGAAGTTT ATGGGATGAC 3327

 Consensus_Fertil 4.140 | 4.160 | 4.180 | 4.200 | 4.220
 TATGCCIAAA GCICAACCTT TAATGGCTTT GGCTAAACCT AGGCTTGCCT AATTATA TCTTTGATAC ATGTTTCATAT TGTGGTGCAC 3957
 Consensus_Steril 4.240 | 4.260 | 4.280 | 4.300 | 4.320
 TATGCCIAAA GCICAACCTT TAATGGCTTT GGCTAAACCT AGGCTTGCCT GTCATTIATA TCTTTGATAC ATGTTTCATAT TGTGGTGCAC 3417

 Consensus_Fertil 4.340 | 4.360 | 4.380 | 4.400 | 4.420
 TTATAAGCAC A----- ATAGACAAAT ACAAGTTTGT ATGGACTCTA ACATGTTGTT TAGTATTAGT ATACTGCAAC TCTACAA- 4035
 Consensus_Steril 4.440 | 4.460 | 4.480 | 4.500 | 4.520
 TTATAAGCAC ACTAGGCTGAA ATAGACAAAT ACAAGTTTGT ATGGACTCTA ACATGTTTAT TAGTATTAGC ATACTGCAAC TCTACAACTA 3507

 Consensus_Fertil 4.540 | 4.560 | 4.580 | 4.600 | 4.620
 -GTAIGTA ATTCTATAA AGTATAACA CAAGTCATAA CGCATTTTGT TTTGAAAAA AAGAGTTTAC ATTGCTTTAC ACCATAAAT 4122
 Consensus_Steril 4.640 | 4.660 | 4.680 | 4.700 | 4.720
 CAAGTATGTA ATCTCTATAA ATTATAACA TAAGTCATAA CGCATTTTGT TTTGAAAAA AAA-GCTAC AGTTTCTTAC ACCATAAAGT 3595

 Consensus_Fertil 4.740 | 4.760 | 4.780 | 4.800 | 4.820
 GTTTCCTTC TAGATTTC TTGGTTATT TAGAAATAA TTTTCAATT TTTTCAATT TTTTCAATT TTTTCAATT CTTATAATAC AAGATAAGAA AAGCGACTAA 4211
 Consensus_Steril 4.840 | 4.860 | 4.880 | 4.900 | 4.920
 GTTTCCTTC TAGATTTC TTGGTTATT TAGAAATAA TTTTCAATT TTTTCAATT TTTTCAATT TTTTCAATT CTTATAAGCAC AAGATAAGAA AATCGACTAA 3685

 Consensus_Fertil 4.940 | 4.960 | 4.980 | 5.000 | 5.020
 CAATATTTCA CAACATTATA TCTTGATAGT TCGTTGAAAT TAATAATTTT CAATAATTTT CAATAATTTT CAATAATTTT CAATAATTTT GTTGGGATAA 4301
 Consensus_Steril 5.040 | 5.060 | 5.080 | 5.100 | 5.120
 CAATATTTCA CAACATTATA TCTTGATAGT TCGTTGAAAT TAATAATTTT CAATAATTTT CAATAATTTT CAATAATTTT CAATAATTTT GTTGGGATAA 3775

 Consensus_Fertil 5.140 | 5.160 | 5.180 | 5.200 | 5.220
 ATTCACGTCA TTTTCAATAA AATCGGAAA TCTTCCCTTG CCATCAAGGA ACAATTTTT CACATCAAAA CTCTTCTTCC AAAAAGTATA 4391
 Consensus_Steril 5.240 | 5.260 | 5.280 | 5.300 | 5.320
 ATTCACGTCA TTTTCAATAA AATCGGAAA TCTTCCCTTG CCATCAAGGA ACAATTTTT CACATCAAAA CTCTTCTTCC AAAAAGTATA 3865

 Consensus_Fertil 5.340 | 5.360 | 5.380 | 5.400 | 5.420
 CTTCTCCAAT GATTATGTAA AAGAGTTTGC ATGTTCTAAT CTATTAGTAT GTATTTTTCC GATAAGAAGT TGTATTACAA GCTTAAATAA 4481
 Consensus_Steril 5.440 | 5.460 | 5.480 | 5.500 | 5.520
 CTTCTCCAAT GATTATGTAA AAGAGTTTGC ATGTTCTAAT CATTAGTAT GTATTTTTCC GATAAGAAGT TGTATTACAA GCTTAAATAA 3955

Abb. 3 (fortwährend)

```

4.520 |
|
Consensus_Fertili AGATATAAAC TTAATTGAAAT ATCGACCAAT CCACAATATG TATCTTCATA TGTGTCATC ACGGCCTAAC CTTGAGATGT AGATCATCTA 4571
Consensus_Sterili AGATATAAAC TTAATTGAAAT ATCGACCAAT CCACAATATG TATCTTCATA TGTGTCATC ACGGCCTAAC CTTGAGATGT AGATCATCTA 4045
4.600 |
|
Consensus_Fertili AAGCACATTA ACATGTCGTA CTCCTCATGT TCAAGG GTTGTTTGA ACCCAACTTC TCCAAAATAC TTCCTCAGTA ATGAAGACAA 4656
Consensus_Sterili AAGCACATTA ACATGTCGTA CTCCTCATGT TCAAGG GTTGTTTGA ACCCAACTTC TCCAAAATAC TTCCTCAGTA ATGAAGACAA 4135
4.700 |
|
Consensus_Fertili AAACTCACAT TCTGAAAAAC ATCAACATTA TGGTTCTATG GTCTAGTGGT TATGACACTG GACTCTGAAT CCAGTAACCC GAGTT 4741
Consensus_Sterili AAACTCACAT TCTGAAAAAC ATCAACATTA TGGTTCTATG GTCTAGTGGT TATGACACTG GACTCTGAAT CCAGTAACCC GAGTT 4220
4.800 |
|
4.840 |
|
4.880 |
|
4.920 |
|
4.960 |
|
4.540 |
|
4.580 |
|
4.620 |
|
4.660 |
|
4.720 |
|
4.760 |
|

```

Abb. 3 (fortwährend)

AAGTGTGGGACAACATAGAGGATTTTTACCCTGAAAGACATTGGCCGTTGGATGGAAGTAGAGTTGAGATTAGCC
ATGGATCTGATTTTAAAAATATTACCATTTAGTGCTGGGAAGAGAAGATGTCTGGGGCCCCACTTGGGGTGGTGT
TTGTGTTGATGGGATTGGCTACACTTTTTATGCATTTGATTGGTTACCACCTGATGGAATGAAGGCAGAAGAAA
TTGATACTAAGGAAGTTTATGGGATGACTATGCCTAAAGCTCAACCTTTAATGGCTTTGGCTAAACCTAGGCTTG
CTCATTTATATCTTTGATACATGTTTATATTGTGGTGCACCTATAAGCACAATAGACAAAATACAAGTTTGTATCG
ACTCTAACATGTTGTTTAGTATTAGTATACTGCAACTCTACAAGTATGTAATTTCTATAAACTATAAACACAAGT
CATAACGCATTTTGTTTTGAAGAAAAAGAGGTTACATTTGCTTACACCATAAA

B

TTAAAAAATAAATTATATTTCTTTATACTTTATTAACCTATTGAGGTTTTTATATTGACTCCCAAATACTATTTT
ATAGATCATGCCATGTTAATGAGCAAACCTACTTTCTCACATCTTTATAGGAGAAAAAGTAGATCACTCCTAGCA
TATCATGACCAGCGAAACCAACCAACGCTAATAGTTTTATTGCTTCCATTAGAGATAAGAGTTAACTAATAATAC
CATCTTTGTGAAATTTTGATGGATTTTGGAACTTTAGCAATATATTTACTGTGTGCACTTTTTGTACCAAATTT
TTATAACCAATGGCTCAAGTCTACTTATACACAACATACAAACTCCCCTCCCGGCCACCAAGGTGGCCCTTATTT
GGAAACCTCCTTCAACTAGGGCCACTTCCCCACCGGATTTTCGCCCTCATTTTGTGAAAAATATGGGCCCTTAGTC
TACATAAGGCTTGGTAATGTGGATGCCATAACCACTAATGATCCAGAAATCATACGTGAGATCTTAGTTCGACAA
GATGATGTATTTGCGTCTCGTCCACATACCTTAGCCGCAACCCACTTGGCTTACAATAGTGGTGATGTGGCCTTG
GCTCCAATGGGACCAAATGGAAAAGAATGAGAAGGATATGCATGGAGCACTTGCTCACAACCTAGACGACTTGAA
CTATTTGTGAGTCATAGGGCTGATGAGGCACGACATTTGGTCCAAGACGTATTAACCTCGTTCCACAAAGATAAA
GTTGTTAATTTGAGGGAAGTGTAGGTGCATTTTCTATGAATAACGTGACTAGAAATGTTGCTAGGGAAGCAATAC
TTTGGGCGGGACGGCGGGCCACAAGAGGCTCTAGAGTTTATGCATATAACACATGAGTTGTTTTGGTTACTA
GGCTTGATTTACTTGGGTGATTATTTGCCTTTTGGAGGTGGGTTGATCCATATGGATGTGAAAAGAAAATGAGG
GAAGTTGAAAAAAGGGTAGATGATTTCCATCGCAAATATAGAGGAACATAGGAAGGAGAAGAAAAGGAAAGAA
GAAATGGGAGTGAATGAGGGTGAATGGATTTGTAGATATTTGTTGGCTTTCCTGGTGAATGGAATGAG
CATATGGATGATGCAGATATTAAGCTCTAATTCAGGATATGATAGCAGCAGCAACAGACACATCAGCTGTAACC
AACGAATGGGCCATGGCAGAAAGTAATAAAACACCCACGTGTCTCCACAAGATCCAACAAGAGCTTAACACAATA
GTAGGACCCAATCGAATGGTAACAGAATCAGATCTTCCCCACCTTAACCTACCTACGTTGTGTGCTACGTGAAACG
TTCCGAATGCATCCAGCAGGACCCTTTTAATCCACATGAATCACTACGCCATAACAATCAACGGCTATGAT
ATCCCATCTGGGACACGTGTCTTATCAACACACATGGGTTAGGACGTAACCTTAAAGTGTGGGACAACATAGAG
GATTTTTACCCTGAAAAGACATTGGCCGTTGGATGGAAGTAGAGTTGAGATTAGCCATGGATCTGATTTTTAAAAA
TTACCATTTAGTGCTGGGAAGAGAAGATGTCTGGGGCCCCACTTGGGGTGGTGTGTTGTTGATGGGATTGGCT
ACACTTTTTCATGCATTTGATTGGTTACCACCTGATGGAATGAAGGCAGAAGAAATTGATACTAAGGAAGTTTAT
GGGATGACTATGCCTAAAGCTCAACCTTTAATGGCTTTGGCTAAACCTAGGCTTGCTCATTTATATCTTTGATAC
ATGTTTATATTGTGGTGCACCTATAAGCACAATAGACAAAATACAAGTTTGTATCGACTCTAACATGTTGTTTAGT
ATTAGTATACTGCAACTCTACAAGTATGTAATTTCTATAAACTATAAACACAAGT

C

MDFGTLAIYLLCALFATKILYQWLKSYLYTTYKLPPGPPRWPLFGNLLQLGPLPHRDFASFCEKYGPLVYIRLGN
VDAITTTNDPEIIREILVRQDDVFSRPHTLAATHLAYNSGDVALAPMGPKWKRMRRICMEHLLTTRRLELFVSHR
ADEARHLVQDVLTRSHKDKVVNLREVLGAFSMNNVTRMLLKGQYFGAGTAGPQEALFEMHITHELFWLLGLIYLG
DYLPFWRWVDPYGCCKMREVEKRVDDFHRKIIIEHRKEKKRKEEMGVNEGEMDFVDILLALPGENGNEHMDDAD
IKALIQDMIAAATDTSAVTNEWAMAIEVIKHPRVLHKKIQEELNTIVGPNRMVTESDLPHLNYLRCVVRETRMHPA
GPFLIPHESLRHTTINGYDIPSGTRVFINTHGLGRNLKVDNIEDFYPERHWP LDGRVEISHGSDFKILPFSAG
KRRCPGAPLGVVFLMGLATLFHAFDWLPPDGMKAEIDTKEVYGMTMPKAQPLMALAKPRLAHLYL

Abb. 4 (fortwährend)

D

GTATATCGTTGCCACATGTGCGTTGAATTTTCTCTTTCCCTATCCTTTCCACTCCATATTCTCCTCAAAAGTGTG
 TAAAAATCCGACACACGAGTAGAATGGGATTGAAGTGGGTCAAGATCTGAAACCAATGGGTCAATGCCACAAAAT
 AAGGTAAGGTTTCTCGCAGTAGCAAAAAATAAAGTTAAGTTGAGAGAAAAATTATGAATAGTTGTTTCTCGTGA
 AGAGTTGTATACAAAAAAGTCTAATTTGATACATTTTCTTTTACATTTATAAAGGATTGACCAATCATCCAAAT
 TACCAAATATTTAGGATATAAATCTTTCAGATTACAACCCATATATGATACACTAAATTTTACATGAGGCAATGG
 AGGATTTGCATGAATATCGAGGAGAGAAAAATTAGTTACAAAACCTGCATAAATTTATCCAAACCAATCAAGTC
 AAGAAACAACGAACAATATTATCATTAGTACTATAAGTATATATTTATAGGCTTAGAGCAAAGCCCTAACTACCAC
 ACTGCACACAAATGATAACTAGTAAGAGAGGAAAAATACAAATTTAAGATTCAACATAGCAAATTTATTCATGATTC
 ATGATTCATGATTCATGATTCATGATTCACGAACATCAAGAAATGGTATAGCTGATAAAGGACAAATTTAAACATAA
 GTGTAAAGCTCGCACATCATCAATTTATTTTCGCATACTACTAGACCAATCTTTACTTAGTACATGTGTTAGTACA
 TGTGTTACTTCATATCAGATGTATTGATTGTTGCCAATGACATATCATGTTTACCTTAATCTTAGGGCCATTTAAT
 TATAACATGGAGAATAATACAACCTTAAAAATATGTGGTGGCTATCATCTCATTTTCTAGATAATTTAAACCTTTAT
 TTTGTATACATATATATTGTCTTTACATAGCAAAAATAATTGAAGGTATAACAACCTTTCCCTTTTCTTTTACT
 ACATGTTTATGTTAGAGTTTTTTCGATTTACGATTGTGGTAAATTAATTGTAATTGATCGGTTGTCTTGTAGTCAA
 GAAATGACGTATGAATCAATTTAGGGCATGTTCTCTTCGGCATAAAACAGCTGAACTGAATTGAACCTGAACCTGAA
 ATGAATAGTGATATGTGAGAGTAAAAGTATTGTCAAGAGCTGAACTGAGCTGAACTGAACGGATCTGAACTGAAC
 TGATCTAATCTGAACTAATCTGAACTGAACTGAACTGAACTGAACTGAACTGAACTGAACTGAACTGAACTGAACTGAA
 CTACTATTATATAACCTCGTTTTAAATATTAGGAAATTAATAAATAAATTTATATTTTCTTTTATACTTTTATTAACCTA
 TTATAACAATAGTGGTGATGTGGCCTTGGCTCCAATGGGACCAAAATGGAAAAGAATGAGAAGGATATGCATGGAG
CACCTTGCTCACAACCTAGACGACTTGAACATTTGTGAGTCATAGGGCTGATGAGGCACGACATTTGGTCCAAGAC
GTATTAACCTCGTTCCCAAAAAGATAAAGTTGTTAATTTGAGGGGAAGTGTTAGGTGCATTTTCTATGAATAACGTG
ACTAGAATGTTGCTAGGGAAGCAATACTTTGGGGCCGGGACGGCCGGGCCACAAGAGGCTCTAGAGTTTATGCAT
ATAACACATGAGTTGTTTTGGTTACTAGGCTTGATTTACTTGGGTGATTATTTGCCTTTTTGGAGGTGGGTGAT
CCATATGGATGTGAAAAGAAAATGAGGGAAGTTGAAAAAAGGGTAGATGATTTCCATCGCAAAATTAGAGGAA
CATAGGAAGGAGAAGAAAAGGAAAAGAAGAAATGGGAGTGAATGAGGTTGAAATGGATTTTGTAGATATTTTGTG
GCTTTGCCTGGTGAATGGAATGAGCATATGGATGATGCAGATATTAAGCTCTAATTCAG GTAATTCATGTA
 TAATTTGAATGTGATACAAAAGTTTGATAGAAAACATATTTGCATAAAATACATGGTTACCCTACTAGACCCAATAA
 AATACATAATTATTGCCTTGCTAGTTGAAAGTTGAAACAACCTAGCTACCATTTTGTGTGATTATCATTAGCCA
 ACCAAAACATTTCTTGCAATCCATATATTAATGTTGAGAGTCGCCATATTTACAATTACTTGTAAACATTTTGGAGC
 AAACAAATTAATAATTTTTTGGCAAGTCCATTTTATTGAATGATACCTATACTTAAAAATGAATCCTTGGTTAT
 GTACACTTGCTTTCAAGGTACCAATATTTGACCATATGTAATTACTATTAACAAAATTTGATAAAAATCTAATAAT
 ATGTAATAATACGTTACGCACATATTAGAAAACAAAGATCACAAAATGATAATGCAAAAATAACTTATTTGAACTAA
 TGTGTGAAGTTAAATTTGGAACAAAAGGTATATTTGATTGCCGAATTTTAATTTATAAATTACTTATAACAAC
 AACTCAATATGTAAAAATGTTAAGATGGAGTGTGGATAGAATGAGATGAGTATACTTTTACTAGTTACCCTCGA
 AATTGCATTTCTCCTTTGTTTATAGTTGTTCTAATCTTATTATCATAAATAAATTTTGGACTTATTTCAATGT
 ATATTTACAACGTTAATTGTTTAAATTTTTTAAAAATACATAATGTAACAAGGATTTTCAATGTTCAATTATACACA
 TTATAGATATTATCTTAAAAAATTTACTAATGCTCAATTAGTGTCCATAATATAGGATATGATAGCAGCAGCAAC
 AGACACATCAGCTGTAACCAACGAATGGGCCATGGCAGAAGTAATAAAACACCCACGTGTCTCCACAAGATCCA
 ACAAGAGCTTAACACAATAGTAGGACCCAATCGAATGGTAACAGAATCAGATCTTCCCCACCTTAACTACCTACG
 TTGTGTCGTACGCGAAACGTTTTCGGATGCATCCAGCAGGACCCTTTTTAAATCCACATGAATCACTACGCCATAC
 AACAATCAACGGCTATGATATCCCATCTGGGACACGTGTCTTTCATCAACACACATGGGTTAGGACGTAACCTTAA
 AGTGTGGGACAACATAGAGGATTTTTTACCCTGAAAGACATTGGCCGTTGGATGGAAGTAGAGTTGAGATTAGCCA
 TGGATCTGATTTTTAAAAATATTACCATTTAGTGTGTTGGGAAGAGAAGATGTCCTGGGGCCCCACTTGGGGTGGTGT
 TGTGTTGATGGGATTGGCTACACTTTTTTCATGCATTTGATTGGTTACCACCTGATGGAATGAAGGCAGAAGAAAT
 TGATACTAAGGAAGTTTATGGGATGACTATGCCTAAAGCTCAACCTTTAATGGCTTTGGCTAAACCTAGGCTTGC
 TCCTCATTTATATCTTTGATACATGTTTATATTTGTTGTTGCACTTATAAGCACACTAGCTCAAATAGACAAATACA
 AGCTTGTATTGACTCTAACATGTTATTTAATATTAGCATACTGCAACTCTACAACCTACAAGTATGTAATCTCTAT
 AAATTATAAACATAAGTCATAACGCATCTTGTTTTTGAAAAAAAAGCTACACTTTCTTACACCATAAACTGTTCC
 GTTACTAAATTTCTTGGCTTATTTTGAATTAATTTTTCAATTTTCTATTTACTTATAACACAAGATAAGAA
 AATCGACTAACAAATTTTCAACAACATTATATCTTGATAGTTTCGTTGAAATTAATAATTTTCAATAATTTCAAAC

Abb. 4 (fortwährend)

GCAAAAAGCTTCTTTGTTCCGATAAATTCACGTCATTTTCAATAAAAATCGCAAAAATCTTCCCTTGCCATCAAGGA
ACAAAATTTTTCACATCAAAACTCTTCTTCCAAAAAGTATACTTCTCCATTGATTATGTAAAAGAGTTTGCATGTT
CTAATCCATTAGTATGTATTTTTCGGATAAGAAGTTGTATTACAAGCTTAAATAAAGATATAAACTTAGTTAAAT
ATCGACCAATCCACAATATGTATCTTCATATGTGTCCATCAGCGCCTAACCTTGAGATGTAGATCATCTAAAGCA
CATTAAACATGGCGTACTCCTCCTGTTCAAATCAGGGTTGTTTGAAACCAAACCTTCTCCAAAATACTTCTCAGTA
ATGAAGAGAAAAACTCACATTCTGAAAAACATCAACATCATGGTTCTATGGTCTAGTGGTTATGACACTGGACTC
TGAATCCAGTAACCCGAGTT

Abb. 4 (fortwährend)

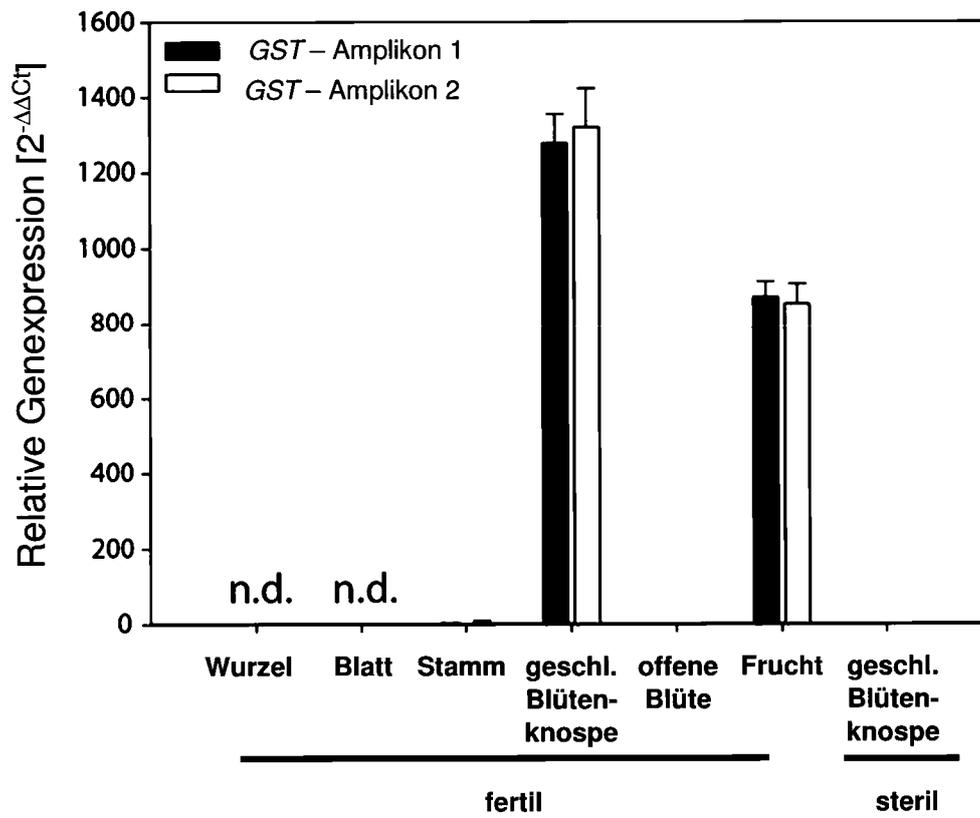


Abb. 5