

Chromosomale Lokalisierung
von repetitiven und unikalen DNA-Sequenzen durch
Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung in der Genomanalyse bei *Beta*-Arten

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematischen-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrecht-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Christine Desel
aus Kassel

Kiel
2002

Referentin: Frau Prof. Dr. K. Krupinska

Koreferent/in: Herr PD Dr. T Schmidt

Tag der mündlichen Prüfung: 27.10.2002

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 6.11.2002

meinem Vater

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	V
Verzeichnis der Abkürzungen	VII
1. Einleitung	1
1.1. Bedeutung der molekularen Cytogenetik	1
1.2. Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung - eine zentrale Methode der molekularen Cytogenetik	2
1.3. Klassifizierung repetitiver DNA im pflanzlichen Genom	5
1.3.1. Tandemartig angeordnete Genomkomponenten	6
1.3.2. Disperse repetitive Sequenzen im pflanzlichen Genom	8
1.4. Genomanalyse und Züchtung nematodenresistenter Zuckerrübenlinien	13
1.5. Ziel der Arbeit	16
2. Material und Methoden	18
2.1. Material	18
2.1.1. Chemikalien und ihre Bezugsquellen	18
2.1.2. Pflanzenmaterial	20
2.1.3. DNA-Sonden	21
2.1.4. Wirts-Vektor-Systeme	22
2.1.5. Standardpuffer und Lösungen	22
2.1.6. Nährmedien und Antibiotika	22
2.2. Methoden	23
2.2.1. Pflanzenanzucht	23
2.2.2. Nematodentest	23
2.2.3. Molekularbiologische Standardmethoden	24
2.2.3.1. DNA-Präzipitation mit Ethanol	24
2.2.3.2. Präparation pflanzlicher Gesamt-DNA	24
2.2.3.3. Gelelektrophorese von DNA	24
2.2.3.4. DNA-Restriktion	25
2.2.3.5. Rückgewinnung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel	25
2.2.3.6. Ligation von DNA-Fragmenten	26
2.2.3.7. Herstellung kompetenter Zellen	26
2.2.3.8. Transformation von Plasmid-DNA in Wirtsbakterien	26
2.2.3.9. Anlegen einer Stammkultur	27
2.2.3.10. Isolierung bakterieller Plasmid-DNA	27
2.2.3.11. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	27
2.2.3.12. Southern-Transfer	28

2.2.3.13.	Radioaktive DNA-Markierung und Hybridisierung	29
2.2.3.14.	Sequenzierung von DNA	30
2.2.3.15.	Sequenzauswertung	32
2.2.4.	Markierung von DNA-Sonden für die Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung (FISH)	32
2.2.4.1.	Sondenmarkierung mit Polymerase-Kettenreaktion	33
2.2.4.2.	DOP-PCR (<i>degenerate oligonucleotide-primed-PCR</i>)	33
2.2.4.3.	Digoxigenin-Markierung von DNA-Sonden durch Random-Priming	34
2.2.4.4.	Nick-Translation	35
2.2.4.5.	Enzymatische Überprüfung der DNA-Markierung	35
2.2.5.	Präparation pflanzlicher Chromosomen	36
2.2.5.1.	Synchronisierung und Fixierung des Pflanzenmaterials	36
2.2.5.2.	Vorbehandlung der Objektträger	37
2.2.5.3.	Präparation von Chromosomen	37
2.2.5.3.1.	Mazeration des pflanzlichen Gewebes	37
2.2.5.3.2.	Spreitung der Chromosomen	38
2.2.6.	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung an mitotischen und meiotischen Chromosomen	40
2.2.7.	Rehybridisierung von Chromosomenpräparaten	43
2.2.8.	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung an gestreckten Chromatinfasern	43
2.2.8.1.	Präparation der Zellkernsuspension	43
2.2.8.2.	Präparation von gestreckten Chromatinfasern	44
2.2.8.3.	<i>fibres</i> -FISH	44
2.2.9.	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung an <i>bacterial artificial chromosomes</i> (BAC)	45
2.2.9.1.	Herstellung der Präparate	45
2.2.9.2.	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung an BAC-Molekülen	45
2.2.10.	Fluoreszenzmikroskopie und digitale Bildverarbeitung	46
2.2.10.1.	Auflicht-Fluoreszenzmikroskopie	46
2.2.10.2.	Mikrophotographie und Digitalisierung	47
2.2.10.3.	Bildbearbeitung	48
3.	Ergebnisse	49
3.1.	Entwicklung hochauflösender Verfahren der Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung für die Genomanalyse in der Gattung <i>Beta</i>	49
3.1.1.	Optimierung der Präparation mitotischer Chromosomen	49
3.1.2.	Darstellung einer vollständigen Meiose in <i>B. vulgaris</i>	53

3.1.3.	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung an gestreckten Chromatin-Fäden	56
3.1.4.	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung an BAC-Molekülen	59
3.2.	Analyse der Genomstruktur der Zuckerrübe <i>Beta vulgaris</i> durch Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung	61
3.2.1.	Identifizierung von Chromosomen durch das Hybridisierungsmuster repetitiver Sequenzen	61
3.2.2.	Lokalisierung repetitiver Sequenzen im Zellkern der meiotischen Prophase I	71
3.2.3.	Physikalische Feinkartierung und Vermessung terminaler Chromosomenregionen durch <i>fibres</i> -FISH	76
3.3.	Strukturelle Analyse von Wildrübenchromosomen aus der Sektion <i>Procumbentes</i>	78
3.3.1.	Physikalische Kartierung von centromerassoziierten und terminal lokalisierten repetitiven Sequenzen in <i>B. procumbens</i>	79
3.3.2.	Lokalisierung centromernaher Satelliten-DNA in <i>B. patellaris</i>	83
3.4.	Anwendung der FISH zur Genomanalyse von Zuckerrübenhybriden	84
3.4.1.	Identifizierung von Wildrübenchromatin und Charakterisierung der Hybridlinien durch Genomische- <i>in situ</i> -Hybridisierung	84
3.4.2.	Identifizierung von Wildrübenchromatin in nematodenresistenten Zuckerrübenlinien durch genomspezifische DNA-Sequenzen	90
3.4.2.1.	Physikalische Feinkartierung des monosomen Chromosomenfragments in der Fragmentadditionslinie PRO1	90
3.4.2.2.	Physikalische Feinkartierung des monosomen Chromosomenfragments in der Fragmentadditionslinie PAT2	95
3.4.3.	Nachweis von Wildrübenchromatin in nematodenresistenten Translokationslinien mit unikalen Sequenzen als Sonden	97
3.4.3.1.	Lokalisierung und Positionierung von translokationsspezifischen YACs in der Translokationslinie A906001	97
3.4.3.2.	Ursache für die verminderte Transmission in nematodenresistenten Zuckerrübenlinien	100
3.4.3.3.	Lokalisierung translokationsspezifischer Sequenzen auf Chromosomen der monosomen Additionslinie und der Wildrübe	103
3.4.3.4.	Vergleichende Lokalisierung des Nematodenresistenzgens <i>Hs I^{pro-1}</i>	105
3.5.	Chromosomale Verteilung von Retrotransposons im pflanzlichen Genom	109
3.5.1.	Ty1- <i>copia</i> -Retrotransposons der Gattung <i>Beta</i>	110
3.5.2.	Chromosomale Lokalisierung von Ty3- <i>gypsy</i> ähnlichen Retroelementen in <i>B. procumbens</i> und <i>Cicer arietum</i>	118
3.5.3.	Verteilung von <i>Non</i> -LTR Retrotransposons (LINEs) im <i>Beta</i> -Genom	120

4. Diskussion	125
4.1. Einsatz der Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung in der Genomanalyse der Gattung <i>Beta</i> : Möglichkeiten und Grenzen	125
4.1.1. Einsatz der Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung zur Genlokalisierung und physikalischen Kartierung	125
4.1.2. Das Auflösungsvermögen der FISH	128
4.1.3. Einsatz der <i>fib</i> re-FISH in der Genomanalyse der Gattung <i>Beta</i>	129
4.2. Strukturelle Organisation von repetitiven Sequenzen in funktionellen Chromosomenbereichen	132
4.2.1. Struktur der terminalen Chromosomendomänen in <i>B. vulgaris</i>	132
4.2.2. Organisation centromerassoziierter repetitiver DNA	136
4.2.3. Verhalten von Centromer- und Telomerregionen in der frühen meiotischen Teilungsphase	140
4.3. Chromosomale Verteilung pflanzlicher Retrotransposons	143
4.4. Karyotypanalyse pflanzlicher Genome durch Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung	147
4.5. Einsatz der FISH in der Pflanzenzüchtungsforschung: Analyse der Genomkomponenten von nematodenresistenten Zuckerrübenlinien	151
4.5.1. Genomische- <i>in situ</i> -Hybridisierung zur Bestimmung der Genomzusammensetzung	151
4.5.2. Einsatz von <i>B. procumbens</i> -spezifischen Satellitensequenzen zur Analyse von Zuckerrübenhybridlinien	154
4.5.3. Möglicher Entstehungsprozeß der Fragmentadditionslinien PRO1 und PAT2	155
4.5.4. Physikalische Kartierung einer Wildrübentranslokation in der Zuckerrübenlinie A906001	157
4.5.5. Mögliche Entstehung und Herkunft der Translokation	159
4.5.6. Ursache für die verminderte Transmission in nematodenresistenten Translokationslinien von <i>B. vulgaris</i>	160
5. Zusammenfassung	164
6. Summary	166
7. Literaturverzeichnis	168
8. Lebenslauf	186
9. Danksagung	187

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abb. 1:	Struktur verschiedener Retrotransposons	10
Abb. 2:	Chromosomenpräparation aus Blattmaterial von <i>Beta vulgaris</i> , <i>Zea mays</i> und <i>Arabidopsis thaliana</i> und Lokalisierung der 18S-5,8S-25S rDNA	52
Abb. 3:	Charakterisierung der Meiosestadien von Pollenmutterzellen (PMC) aus jungen <i>Beta</i> -Antheren nach DAPI-Färbung	55
Abb. 4:	(A) FISH an gestreckten Chromatinfasern der Translokationslinie von <i>B. vulgaris</i> (A906001) (B) Physikalische Kartierung eines BAC-Klons	59
Abb. 5:	Einteilung der Chromosomen durch das Hybridisierungsmuster des interkalaren <i>EcoRI</i> -Satelliten pEV1	67
Abb. 6:	Karyotypanalyse von <i>B. vulgaris</i> durch Kombination der Hybridisierungsmuster repetitiver Sequenzen	70
Abb. 7:	(A-C) Paarung homologer Chromosomen in der Prophase I (D-G) Identifizierung der heterochromatischen Regionen im meiotischen Prophase-I-Nukleus	72
Abb. 8:	Lokalisierung terminaler Chromosomenregionen während der frühen Meiose	75
Abb. 9:	Feinkartierung der terminalen Chromosomenregionen in <i>B. vulgaris</i>	78
Abb. 10:	Physikalische Kartierung von zentromerassoziierten repetitiven Sequenzen in der Wildrübe <i>B. procumbens</i> und <i>B. patellaris</i>	81
Abb. 11:	Zentromermodell von <i>B. procumbens</i>	82
Abb. 12:	Nachweis von Wildrüben-DNA in nematodenresistenten Hybridlinien von <i>B. vulgaris</i> durch <i>in situ</i> -Hybridisierung genomischer DNA (GISH)	87
Abb. 13:	Detektion und physikalische Kartierung des Wildrübenfragments in den Linien PRO1 und PAT2	93
Abb. 14:	Lokalisierung und physikalische Kartierung der Wildrübentranslokation auf Chromosomen der homozygoten resistenten Linie A906001 von <i>B. vulgaris</i>	99
Abb. 15:	Meiotische Stabilität der Translokation	102
Abb. 16:	Vergleichende Hybridisierung der YACs an Additionslinie und Wildrübe	104
Abb. 17:	Amplifikation eines Ty1- <i>copia</i> -typischen DNA-Fragments aus dem YAC128	105
Abb. 18:	Chromosomale Lokalisierung des Nematodenresistenzgens <i>HsJ^{pro-1}</i>	107
Abb. 19:	Schematische Darstellung der Struktur der Translokation und der	108

	Lage des Nematodenresistenzgens in der resistenten Rübenlinie A906001.	
Abb. 20:	Vergleichende chromosomale Lokalisierung pflanzlicher LTR-Retrotransposons	112
Abb. 21:	Darstellung der Sequenzdivergenz von Retroelementen	116
Abb. 22:	Hybridisierung von genomischer DNA aus <i>B. vulgaris</i> , <i>B. procumbens</i> und <i>B. corolliflora</i> mit DNA klonierter Fragmente der Reverse Transkriptase der Ty1- <i>copia</i> -Retroelemente.	117
Abb. 23:	Vergleichende chromosomale Lokalisierung pflanzlicher LTR-Retrotransposons und <i>Non</i> -LTR-Retrotransposons	121
Abb. 24:	Modell der Entstehung des PRO1-Chromosomenfragments	156
Abb. 25	Möglicher Mechanismus der zum Verlust des Resistenzgens in der Translokationslinie A906001 führt	162
Tab. 1:	Transponible Elemente pflanzlicher Genome	9
Tab. 2:	Taxonomie, Chromosomenverhältnisse und Verbreitungsgebiet der Arten der Gattung <i>Beta</i>	13
Tab. 3	Übersicht über nematodenresistente Zuckerrübenlinien	20
Tab. 4:	DNA-Sonden für die Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung (FISH)	21
Tab. 5.1:	Fluoreszenzeigenschaften von FITC, Cy3 und DAPI	46
Tab. 5.2:	Verwendete Filtersätze und ihre Eigenschaften	47
Tab. 5.3:	Ermittelte Belichtungszeiten (sec)	48
Tab. 6:	DNA-Sonden, die zur Identifizierung von Chromosomen in <i>B. vulgaris</i> eingesetzt wurden.	64
Tab. 7:	Klonierte PCR-Produkte nach Amplifikation mit Ty1- <i>copia</i> -spezifischen Primern aus genomischer DNA	114

Verzeichnis der Abkürzungen

A	Adenin
Ac	<i>activator</i>
AFLP	<i>amplified fragment length polymorphism</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BCIP	5-Brom-4-Chlor-2-Indolyphosphat
BLAST	<i>basic local alignment search tool</i>
bp	<i>base pairs</i>
BSA	<i>bovine serum albumine</i> (Rinderserumalbumin)
C	Cytosin
Cy 3	Indocarbocyanin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
dpi	<i>dots per inch</i>
Ds	<i>dissociator</i>
dTTP	Desoxythymintriphosphat
dUTP	Desoxyuraciltriphosphat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMBL	<i>European Molecular Biology Laboratory</i>
En	<i>enhancer</i>
ETS	Externer transkribierter Spacer
FISH	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
G	Guanin
GISH	Genomische <i>in situ</i> -Hybridisierung
h	Stunde
H ₂ O	destilliertes Wasser
IPTG	1-Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid
ITS	Interner transkribierter Spacer
KAc	Kaliumacetat
kb	Kilobase
LINE	<i>long interspersed elements</i>
LTR	<i>long terminal repeat</i>
Mbp	<i>mega base pairs</i> (Megabasenpaare)
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
MITEs	<i>miniature inverted-repeat transposable elements</i>
ml	Milliliter
Mu	<i>mutator</i>
NaCl	Natriumchlorid

NaOH	Natriumhydroxid
NBT	4-Nitroblautetrazololiumchlorid
NOR	Nukleolus-organisierende Region
nt	Nukleotid
NTS	Nichttranskribierter Spacer
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RAPD	<i>random amplified polymorphic DNA</i>
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SINE	<i>short interspersed elements</i>
Spm	<i>supressor mutator</i>
T	Thymin
TIR	terminale invertierte Repeats
U	Enzymeinheit (<i>unit</i>)
UE	Untereinheit
Vol.	Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-Galactopyranosid
YAC	<i>yeast artificial chromosome</i>

1. Einleitung

1.1. Bedeutung der molekularen Cytogenetik

Ein fundamentales Ziel der meisten Biowissenschaften ist die Analyse von Genomen. Das Genom, die Gesamtheit der genetischen Information eines Organismus, ist in Pflanzen überwiegend im Nukleus und zu einem geringen Anteil in den Mitochondrien und den Plastiden lokalisiert (nach HEMLEBEN, 1990). Das Kerngenom besteht aus mehrere Nukleinsäuremolekülen, die während der Zellteilung kondensieren und die sogenannten Chromosomen bilden. Die Analyse der Struktur und der genetischen Organisation der nukleären DNA bzw. der Chromosomen führt zum besseren Verständnis der Genetik von Organismen und der Vererbung von Merkmalen (nach HAGEMANN, 1999).

Genome werden mit genetischen, molekularbiologischen sowie mit cytologischen Verfahren untersucht (LOTTSPEICH & ZORBAS, 1998). Durch molekulargenetische Techniken - wie beispielsweise die Klonierung von genomischen DNA-Fragmenten oder Anwendung von molekularen Markersystemen - werden DNA-Sequenzklassen und pflanzliche Gene identifiziert und genetische Genomkarten aufgestellt (nach HAGEMANN, 1999). Klassische cytogenetische Methoden, wie Färbe- und Bänderungstechniken, ermöglichen Chromosomenstruktur- und Karyotypanalysen in vielen Tier- und Pflanzenarten (nach TRAUT, 1991). Durch die Kombination molekulargenetischer Verfahren mit klassischen Techniken der Chromosomenanalyse entwickelte sich die molekulare Cytogenetik. Sie verknüpft die Arbeitsfelder Molekularbiologie und Cytologie miteinander und besitzt daher integrativen Charakter (HEISKANEN *et al.*, 1996; RAAP, 1998). Genetische Daten und zellbiologische Befunde werden korreliert und Untersuchung auf unterschiedlichen biologischen Strukturebenen ermöglicht (JIANG & GILL, 1994; HEISKANEN *et al.*, 1996).

Molekular cytogenetische Verfahren erlauben Analysen der Chromosomenstruktur und Genomzusammensetzung als auch die Lokalisierung von Genen (LEITCH *et al.*, 1994; SCHWARZACHER & HESLOP-HARRISON, 2000). Die Ergebnisse tragen zu einem besseren Verständnis der Architektur des Zellkerns, als auch der Organisation und der Evolution der Genome bei (HESLOP-HARRISON, 2000; JIANG & GILL, 1994). Cytogenetische Verfahren können deshalb zur Beantwortung von vielfältigen Fragestellungen hinsichtlich der genetischen und chromosomalen Genomorganisation eingesetzt werden. Ein breites Anwendungsgebiet bietet sich sowohl in der Humangenetik als auch der Pflanzenzüchtungsforschung.

Die zentrale Methode der molekularen Cytogenetik ist die *in situ*-Hybridisierung (ISH) (GALL & PARDUE, 1969; LANGER-SAFER *et al.*, 1982). Durch die ISH können Nukleinsäuresequenzen innerhalb intakter Gewebe-, Kern- oder Chromosomenstrukturen mittels Licht-, Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopie optisch nachgewiesen werden. Für eine Detektion und Lokalisierung von DNA-Sequenzen entlang Chromosomenstrukturen eignet sich insbesondere die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH), bei der ein Nachweis durch Fluorochrome erfolgt (MANUELIDIS *et al.*, 1982).

1.2. Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung - eine zentrale Methode der molekularen Cytogenetik

Die *in situ*-Hybridisierung wurde 1969 von GALL & PARDUE entwickelt. Zunächst wurden radioaktive oder enzymatische Nachweisverfahren verwendet. Spätere Arbeiten zeigten, dass für die DNA:DNA-*in situ*-Hybridisierung die Verwendung von Fluorochrom-markierten DNA-Sonden (MANUELIDIS *et al.*, 1982) entscheidende Vorteile bietet. Fluorochrom-markierte Sonden gewährleisten eine höhere Nachweissensitivität, stärkere Kontraste zwischen Präparatstrukturen und Hybridisierungssignal und einen geringeren experimentiellen und zeitlichen Aufwand (RAAP, 1998). In der pflanzlichen Genomanalyse wurde die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) erstmalig 1985 eingeführt (RAYBURN & GILL, 1985).

Eine besondere Modifikation der FISH ist die Genomische-*in situ*-Hybridisierung (GISH), bei der das gesamte Genom einer Art durch Einsatz genomischer DNA als Sonde markiert wird (SCHWARZACHER *et al.*, 1989). Dies ermöglicht die Differenzierung von Chromosomen unterschiedlicher Herkunft und somit Untersuchungen der Genomzusammensetzung von Hybridpflanzen und natürlichen Arthybriden (PARAKONNY *et al.*, 1993; SCHWARZACHER *et al.*, 1989; MIKHAILOVA *et al.*, 1998; MOLNAR-LANG *et al.*, 2000; RODRIGUEZ *et al.*, 2000). GISH erlaubt die Lokalisierung ganzer Genome, einzelner addierter Chromosomen, Chromosomenfragmente oder Translokationen im Genom von Hybriden (SCHWARZACHER *et al.*, 1992; DESEL *et al.*, 2002). Eine vorheriger Identifizierung und Klonierung von genomspezifischen DNA-Sequenzen ist nicht notwendig. Voraussetzung für die erfolgreiche Anwendung der GISH ist ein ausreichend großer phylogenetischer Abstand der parental Genome, der einen hohen Anteil an genomspezifischen DNA-Sequenzen in der Genomsonde bedingt.

Bei der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) und auch bei der Genomischen-*in situ*-Hybridisierung (GISH) werden die hybridisierten Proben entweder direkt oder indirekt

detektiert. Werden Fluorochrom-gekoppelte Nukleotide in die DNA-Sonde inkorporiert, kann der Hybridisierungsort unmittelbar optisch lokalisiert werden. Bei einem indirekten Nachweis werden dagegen Nukleotide mit gekoppelten Reporter-molekülen (z.B. Biotin oder Digoxigenin) in die Sonden-DNA eingebaut. Eine Detektion der hybridisierten Sonde erfolgt nach Bindung von Fluorochrom-gekoppeltem Avidin oder Antikörpern. Der indirekte Nachweis führt zu einer Signalverstärkung und dadurch zu einer höheren Sensitivität des Detektionsverfahrens.

Für FISH-Experimente können eine Vielzahl verschiedener Fluorochrome eingesetzt werden. Dazu zählen unter anderem FITC (Fluoresceinisothiocyanat, grüne Fluoreszenz), Texas Red (rote Fluoreszenz), AMCA (Aminomethylcoumarin-essigsäure, blaue Fluoreszenz) oder die CyanineTM (z.B. Cy2 grün; Cy5.5 infrarot oder Cy3 rot). Um die Morphologie der nicht-hybridisierten Chromatinstrukturen zu erkennen, werden Chromosomen und Zellkerne gegengefärbt. Hierzu werden üblicherweise die Fluorochrome DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol) oder Propidiumiodid verwendet, die blaue bzw. rote Fluoreszenz emittieren (nach SCHWARZCHER & HESLOP-HARRISON, 2000).

Da Fluorochrome mit unterschiedlichen Emissionsspektren verfügbar sind, ist ein gleichzeitiger Einsatz von mehreren DNA-Sonden möglich, die sich differentiell darstellen lassen (Vielfarben-FISH oder *multi-colour* FISH; LEITCH *et al.*, 1991; LICHTER, 1997). Die *multi colour* FISH erlaubt die relative Positionierung mehrerer DNA-Marker im Genom oder entlang eines Chromosomes. In der Humangenetik wurden Markierungsverfahren erarbeitet, durch die die FISH-Sonde mit einer Mischung aus mehreren Fluorochromen markiert werden. Je nach Konzentrationen der verschiedenen Fluorochrom-gekoppelten Nukleotide im Markierungsansatz inkorporieren variierende Anteile in die DNA-Sonde (*ratio labeling*). Dies Verfahren erlaubt eine simultane *in situ*-Hybridisierung von zwölf DNA-Sonden, die unter Einsatz von nur drei verschiedenen Fluorochromen markiert wurden und durch ihre unterschiedlichen Emissionsspektren detektiert und differenziert werden können (DAUWERSE *et al.* 1992; GRUNDLACH *et al.*, 2001). Eine Steigerung der *multi-colour* FISH gelang durch kombinatorische Markierung von fünf Fluorochromen. Alle 24 humanen Chromosomen konnten daraufhin durch differente Emissionsspektren detektiert (SCHRÖCK *et al.*, 1996; SPEICHER *et al.*, 1996) und mit Hilfe von digitalen Analyseverfahren (z.B. *spectral karyotyping*, SKY; ZHANG *et al.*, 2000) in distinkten Pseudofarben wiedergegeben werden (*chromosome painting*). Dies ermöglicht die sichere Erkennung chromosomaler Veränderungen und den Einsatz der *multi-colour* FISH in der cytogenetischen Diagnose humaner Chromosomen (LICHTER, 1997).

Der Erfolg und die Effizienz des Nachweises einer Nukleinsäuresequenz durch FISH ist von der Länge der hybridisierten Zielsequenz, der Häufigkeit der Zielsequenz im Genom, der Anzahl der gebundenen Reportermoleküle in der eingesetzten DNA-Sonde und dem angewendeten Nachweisverfahren abhängig. Die Entwicklung von unterschiedlichen Markierungsmethoden, neuartigen Fluorochromen, neuen Techniken der Chromosomenpräparation und nicht zuletzt die Weiterentwicklung der Mikroskopie- und Bildverarbeitungstechnologie gestattet den Nachweis von immer enger benachbarten und immer kürzeren DNA-Fragmenten. Das Auflösungsvermögen und die Sensitivität der FISH-Verfahren wurde somit stetig verbessert.

Entscheidend für das Auflösungsvermögen der DNA-DNA-FISH ist der Kondensationsgrad der Zielsequenz. Mitotische, hochkondensierte Metaphasechromosomen besitzen eine Auflösungsgrenze von ungefähr 1Mb (HEISKANEN *et al.*, 1996). Meiotische Pachytänchromosomen in Pflanzen sind dagegen je nach Art 10-50x länger als mitotische Metaphasechromosomen (DE JONG, 1981). Loci mit Distanzen von 50 kb wurden durch FISH an Pachytänchromosomen differenziert (FLORIJN *et al.*, 1996; RAAP *et al.*, 1996).

Zu einer weiteren Steigerung des Auflösungsvermögens der FISH-Technik führte die Entwicklung der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung an gestreckten Chromatin-Fäden, der sogenannten *fibres*-FISH (HENG *et al.*, 1992; WIEGANT *et al.*, 1992). Dabei wird die dekontensierte DNA von Interphasenuklei nach Lyse der Kernmembran und Auflösung der nukleären Matrix entlang der Glasoberfläche eines Objektträgers gestreckt. Die Streckung erfolgt hydrodynamisch durch langsames Abfließen des Lysepuffers, der die freigesetzte und partiell an der Glasoberfläche fixierte DNA enthält. Es entstehen DNA-Stränge mit 2-4 kb/ μm (JACKSON *et al.*, 1998; FRANZ *et al.*, 1996a). Dieser Wert liegt im Bereich des Streckungswertes einer linearisierten Duplex-B-DNA, die 2,941 kb/ μm aufweist (WATSON & CRICK, 1953). An die auf den Objektträger fixierten DNA-Fäden können DNA-Sonden hybridisiert werden. Eine lineare Anordnung der Hybridisierungssignale entlang der Chromatinfäden erlaubt die Detektion von Distanzen kleiner 1 kb (FAN *et al.*, 1990; FLORIJN *et al.*, 1995; FRANZ *et al.*, 1996a). Dieses hochauflösende *fibres*-FISH-Verfahren ermöglicht daher die genaue Positions- und Orientierungsbestimmung von eng benachbarten Zielsequenzen und eine physikalische Feinkartierung von Chromosomenregionen (CHENG *et al.*, 2001a).

Die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) an mitotischen und meiotischen Chromosomen gestattet hingegen eine physikalische Kartierung von DNA-Abschnitten mit

geringerer Auflösung. Im Gegensatz zur *fibres*-FISH ist aber eine direkte Zuordnung molekularer Marker zu chromosomalen Regionen möglich (JIANG *et al.*, 1995; JACKSON *et al.*, 1999; CHENG *et al.*, 2001; LYSAK *et al.*, 2001). DNA-Marker, die in unabhängig erstellten genetischen oder physikalischen Kopplungskarten integriert sind, können durch FISH direkt kartiert und chromosomalen Regionen zugeordnet werden (PETERSON *et al.*, 1999).

Bedeutend für die Einsatzmöglichkeiten der FISH-Verfahren ist die Sensitivität. Der Nachweis von Zielsequenzen kleiner 1 kb gelang an humanen Metaphasechromosomen erstmalig 1990 (FAN *et al.*, 1990) und wurde seitdem zahlreich wiederholt. In Pflanzen konnte die Nachweisgrenze von 1 kb bisher (11 Jahre später!) nur vereinzelt erreicht wurde (FRANSZ *et al.*, 1996b; TEN HOOPEN *et al.*, 1996; OHMIDO *et al.*, 1998, DESEL *et al.*, 2001). Auch die *in situ*-Hybridisierung an gestreckten Chromatin-Fäden (*fibres*-FISH) wurde erst relativ spät von FRANSZ *et al.* (1996) mit pflanzlichem Material erfolgreich durchgeführt und zählt immer noch zu den schwierigen und anspruchsvollen Verfahren der FISH-Anwendungen.

Dagegen konnten repetitiven Sequenzen und Multigenfamilien an pflanzlichen Chromosomen oder vereinzelt auch an Chromatin-Fäden bislang oft und erfolgreich durch Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung nachgewiesen werden. Durch die chromosomale Lokalisierung repetitiver Sequenzen wurden zahlreiche Beiträge zur Analyse des Genomaufbaus und der Genomorganisation verschiedener agronomisch bedeutender Arten geleistet (*Vicia faba*: FUCHS *et al.*, 1994; *Arabidopsis thaliana*: HESLOP-HARRISON, 1996; *Hordeum vulgare*: LEITCH & HESLOP-HARRISON, 1993; *Triticeae*: PEDERSEN *et al.*, 1996; *Beta vulgaris*: SCHMIDT *et al.*, 1994; 1996; 1997; 1999).

1.3. Klassifizierung repetitiver DNA im pflanzlichen Genom

Die nukleäre DNA beinhaltet unterschiedliche DNA-Sequenztypen, die entweder in einer oder wenigen Kopien im Genom vorliegen und solchen, die sich häufig wiederholen (repetitiv angeordnet sind). Zu den unikal DNA-Sequenzen gehören die meisten Strukturgene, aber auch weitere DNA-Sequenzen mit unbekannter Funktion (nach HAGEMANN, 1999). Der Anteil repetitiver Sequenzen am Kerngenom höherer Pflanzen liegt zwischen 50% und 90% (nach HESLOP-HARRISON, 2000). Repetitive Sequenzen sind verantwortlich für die extremen Schwankungsbreiten der Genomgrößen, die sich bei Arten mit ähnlicher Genzahl beobachten lassen (FLAVELL, 1986; LAPITAN, 1992; OHMIDO *et al.*, 2000).

Für alle Gefäßpflanzen wird eine annähernd gleiche Anzahl von etwa 25000 Genen angenommen (HESLOP-HARRISON, 2000), trotzdem besitzen insbesondere höhere Pflanzen eine bis zu 2500-fache Variation ihres DNA-Gehaltes (BENNETT & SMITH, 1976). Durch das

Auftreten von längeren Gensequenzen oder zahlreicheren Introns in den Genen lässt sich die große DNA-Menge in den Kernen vieler Pflanzen nur unzureichend erklären. Zum Teil sind die sehr unterschiedlichen Größen des absoluten DNA-Gehalts bei Pflanzen in der Polyploidisierung begründet (70-80% der höheren Pflanzen sind polyploid) (LEITCH & BENNETT, 1997). Indes bieten die unterschiedlichen Ploidiegrade von Pflanzenzellen ebenfalls keine ausreichende Erklärung für die tatsächlich vorhandene Komplexität und Variabilität der Genome. Bedeutend ist vielmehr, dass mit zunehmenden DNA-Gehalt der Anteil repetitiver Sequenzen des haploiden Genoms ansteigt. Der Anteil repetitiver Sequenzen schwankt zwischen 25% bei *Arabidopsis thaliana* (MEYEROWITZ & PRUITT, 1985) und 93% bei *Triticum aestivum* (RANJEKAR *et al.*, 1976). Durch genetische und biochemische Analysen konnte bestätigt werden, dass die Variabilität der Genomgrößen im Wesentlichen durch unterschiedliche Mengen der repetitiven DNA im Genom verursacht wird (FLAVELL *et al.*, 1974; SMYTH, 1991).

Repetitive Sequenzen treten in zwei Organisationsformen auf. Sie können entweder tandemartig in Blöcken angeordnet sein oder aber dispers im Genom verstreut vorliegen. Beide Organisationsformen wurden bisher in allen daraufhin untersuchten Pflanzengenomen gefunden (LAPITAN, 1992; KUMAR & BENNETZEN, 1999).

1.3.1. Tandemartig angeordnete Genomkomponenten

Die tandemartig angeordneten Genomkomponenten lassen sich hinsichtlich ihres Repetitionsgrades einteilen in hochrepetitive (10^5 - 10^6 Kopien pro Genom) und mittelrepetitive (10^2 - 10^4 Kopien pro Genom) Sequenzen (nach HEMLEBEN, 1990). Zu den im Genom hochamplifizierten DNA-Klassen gehören die Satellitenfamilien, die Minisatelliten und die Mikrosatelliten sowie die Telomersequenzen. Mittelrepetitiv sind die Gene der ribosomalen RNA und der Histone (HESLOP-HARRISON, 1996; 2000).

Das wiederkehrende Sequenzmotiv ist bei nicht-kodierenden Sequenzen - wie Satelliten-DNA und Telomer-DNA - kürzer als bei der kodierenden rDNA. Die Repeatlänge eines Monomers der Satelliten-DNA liegt bei 150-180 bp oder bei 300-360 bp, während rDNA eine Länge bis 18,5 kb aufweisen kann (LAPITAN, 1992). Durch den Einsatz von Restriktionsenzymen, Klonierung und DNA-Sequenzierung konnten inzwischen für viele Pflanzen hochrepetitive Satelliten-DNAs auf molekularem Niveau charakterisiert werden. Die Sequenzen von Satelliten-DNAs sind häufig art- oder gattungsspezifisch und können als artspezifische Marker bei der Analyse von Hybriden eingesetzt werden (SCHMIDT *et al.*, 1997a). Satelliten-DNA ist bevorzugt im pericentromerischen, interkalaren und subtelomerischen

Heterochromatin lokalisiert. Diese stärker anfärbbaren chromosomalen Regionen enthalten dicht kondensierte, transkriptionsinaktive DNA. Eine auffallend hohe Methylierungsrate (20-30% der Cysteinreste können am 5-C-Atom durch eine Methylgruppe modifiziert sein) beeinflusst wahrscheinlich die Expression von Genen und induziert Chromatinkonformationen, die die Transkription unterdrücken (nach FLAVELL & MOORE, 1996). Die Amplifikation der Repeats im Genom könnte durch ungleiche inter- bzw. intrachromosomale Rekombination zwischen Genomabschnitten mit tandemartig angeordneten Sequenzen erfolgen, die eine hohe Homologie aufweisen (MCALLISTER & WERREN, 1999).

Die Funktion der Satelliten-DNA ist weitgehend unbekannt. Ihr Vorkommen in allen eukaryotischen Organismen und die ähnliche Größe der Wiederholungseinheiten lassen eine Funktion bei der Bildung der Chromosomenstruktur und der Organisation der DNA in den Nukleosomen vermuten (HESLOP-HARRISON, 2000). Vorstellbar ist weiterhin, dass Rekombinationprozesse zwischen nicht-homologen Loci durch Satelliten-DNA-Sequenzen initiiert werden. Der Satelliten-DNA käme demnach eine Funktion bei der Entstehung genetischer Variabilität sowie der Genomevolution zu.

Minisatelliten bzw. Mikrosatelliten gehören ebenfalls zu den hochrepetitiven, tandemartig angeordneten DNA-Sequenzen. Sie bestehen aus sehr kleinen Monomereinheiten von 1-5 bp und existieren in vielen Loci im Genom (HAGEMANN, 1999). Aufgrund ihres hohen Polymorphiegrades (VNTR, *variable number of tandem repeats*) sind sie wertvolle artspezifische Marker, die zur Selektion und Identifikation von Hybridlinien verwendet werden können (*finger printing*) (SCHMIDT & HESLOP-HARRISON, 1996; SCHMIDT *et al.*, 1997).

Den physikalischen Abschluß vieler pflanzlicher Chromosomen bilden tandemartig angeordnete hochkonservierte DNA-Sequenzen mit dem Konsensus (TTTAGGG)_n. Die Anzahl der telomerischen Repeats ist artspezifisch. In *Arabidopsis* erstrecken sich die Repeats über eine Länge von 2-5 kb (RICHARD & AUSUBEL, 1988), während sie in Tabak über 60-160 kb angeordnet sind (FAJKUS *et al.*, 1995). Sie werden distal von einem 3'-G-reichen und einem 5'-C-reichen DNA-Bereich abgeschlossen, wobei überhängende G-Reste eine Haarnadelstruktur formen, die Erkennungsmotiv der Telomerase ist (PARDUE & BARYSHE, 1999). Die Telomerase ist ein Ribonukleoprotein, das die Addition von einzelnen Nukleotiden an das 3'-Ende katalysiert. Die telomerischen Sequenzen stabilisieren die

Chromosomenenden und verhindern den Verlust von terminalen Nukleotiden während der Replikation (MCKNIGHT *et al.*, 2002).

Die telomerischen Repeats sind in vielen Arten, z.B. Tomate und Roggen, proximal mit subtelomerischen repetitiven Sequenzen assoziiert (FAJKUS *et al.*, 1995; VERSHININ *et al.*, 1995). Auch diese Satellitenfamilien besitzen eventuell Bedeutung bei der Ausbildung der Struktur der Chromosomenenden und dienen zum Schutz der terminalen Chromosomenregionen (ZHONG *et al.*, 1998; GARRIDO-RAMOS *et al.*, 1999; ALKHIMOVA *et al.*, 1999).

Zu den mittelrepetitiven Sequenzen gehören Gene der ribosomalen RNA (rDNA). Die Gene für die 18S-5,8S-25S rRNA liegen als Transkriptionseinheit, bestehend aus hochkonservierten, kodierenden Abschnitten und variablen Spacerregionen, tandemartig angeordnet vor (nach HEMLEBEN, 1990). Die rDNA-Loci sind mit dem NOR (*nucleolar organisation region*) identisch. Sie können eine Länge von 7,8 kb–18,5 kb besitzen und in einer Anzahl von 600-8500 Kopien pro haploiden Genom vorliegen (LAPITAN, 1992).

Die 5S rRNA-Gene sind räumlich getrennt von den 18S-5,8S-25S rRNA-Loci. Die tandemartig angeordneten Einheiten von 200-900 bp, bestehend aus einer kodierenden Region von 120 bp und variablen Spacern, sind in 1000-50000 Kopien pro haploidem Genom vorhanden (ELLIS *et al.*, 1988; nach HEMLEBEN, 1990; RÖDER *et al.*, 1992).

1.3.2. Disperse repetitive Sequenzen im pflanzlichen Genom

Die dispers im Genom angeordneten repetitiven Sequenzen besitzen im Vergleich zu den tandemartig angeordneten Sequenzen eine höhere Heterogenität bezüglich ihrer Größe und Struktur (SMYTH, 1991). Zu den dispers im Genom verteilten Sequenzen gehören die transponierbaren oder mobilen Elemente, die die Fähigkeit haben, sich von einer Stelle in einer DNA-Sequenz an eine andere Stelle innerhalb desselben Chromosomes oder in ein anderes Chromosome zu verlagern. Dieser Vorgang wird als Transposition bezeichnet (HAGEMANN, 1999). Die ersten Befunde, die die Existenz von beweglichen DNA-Komponenten im Genom aufzeigten, wurden in den fünfziger Jahren von B. MCCLINTOCK durch Untersuchung der genetischen Instabilität von Genen in *Zea mays* erbracht (MCCLINTOCK, 1954). Seitdem wurde die Struktur und Wirkungsweise weiterer genetischer transponibler Elemente in höheren Pflanzen untersucht und charakterisiert (Tab. 1, FLAVELL, 1994).

Nach dem Prinzip der Transposition werden Klasse I-Elemente (Retrotransposons) und Klasse II-Elemente (Transposons) unterscheiden. Die Elemente der Klasse II werden am bisherigen Ort im Genom ausgeschnitten und an einen neuen Ort verlagert (konservative Transposition). Bei den Elementen der Klasse I wird die DNA repliziert und kann in multiplen Orten im Genom inseriert werden (replikative Transposition). Die Replikation und Transposition der transponiblen Elemente ist ein komplexer Prozess für den mehrere Enzyme notwendig sind (BENNETZEN, 1996). Bei den Retrotransposons (Klasse I-Elemente) erfolgt die Transposition über ein RNA-Intermediat und deren reverse Transkription. Die Retrotransposons kodieren daher u.a. für eine RNA-abhängige DNA-Polymerase (RT: Reverse Transkriptase).

Tab. 1: Transponible Elemente pflanzlicher Genome (verändert nach FLAVELL, 1994)

Transposonfamilie	Terminale Repeats oder Sequenzwiederholungen	Transpositions-Intermediat	Exzission	
Klasse I	Retrotransposons			
	Ty1- <i>copia</i> -Retrotransposons	ja (LTR)	RNA	nein
	Ty3- <i>gypsy</i> -Retrotransposons	ja (LTR)	RNA	nein
	Non-LTR-Retrotransposons	nein (mitunter kurze direkte Repeats)	RNA	nein
Klasse II	Transposons			
	Ac-Ds-Transposons	ja (11 bp)		ja
	En/Spm (5'-CACTA3')- Transposons	ja (13 bp)		ja
	Mu-Transposons	ja (200 bp)		ja
Unklassifizierte Transposons (MITEs)	ja (11-14 bp)	DNA?		?

Sehr unterschiedliche Formen von Retrotransposons konnten bisher im pflanzlichen Genom charakterisiert werden (BENNETZEN, 1996; 1998; KUMAR & BENNETZEN, 1999). Die LTR-Retrotransposons, die Ty1-*copia*- und Ty3-*gypsy*-Elemente, werden von langen terminalen Repeats (LTR: *long terminal repeat*) begrenzt. Die DNA-Sequenzen zwischen den LTRs enthalten bis zu drei offene Leseraster (ORFs: *open reading frames*) und kodieren u.a. für die Enzyme, die an der Transposition beteiligt sind. Die Ty1-*copia*- und Ty3-*gypsy*-Elemente unterscheiden sich in der Anordnung der Gene. Während die Ty3-*gypsy*-Elemente dieselbe Genanordnung zeigen wie Retroviren, weisen Ty1-*copia*-Elemente eine veränderte Folge der Gene in der internen Dömane auf (Abb. 1).

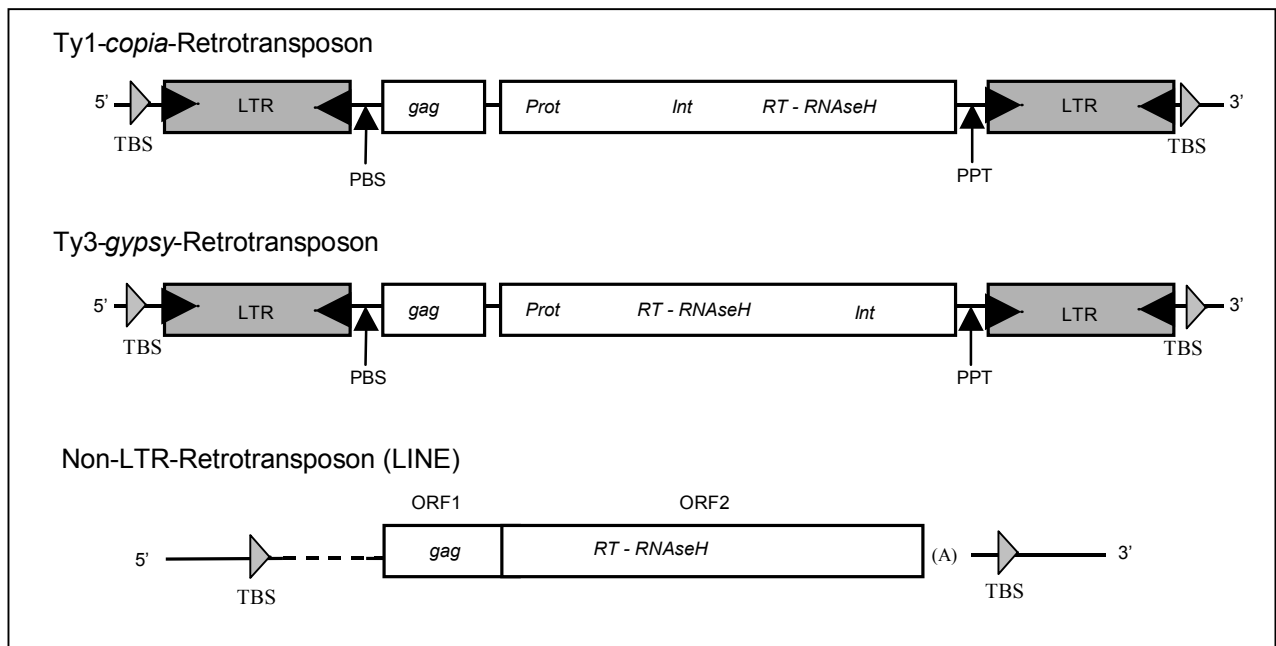


Abb. 1: Struktur verschiedener Retrotransposons. Die LTR-Retrotransposons, die Ty1-*copia*- und Ty3-*gypsy*-Elemente, werden von langen terminalen Repeats (LTR: *long terminal repeat*) begrenzt (Pfeile). In der internen Domäne sind die Gene lokalisiert: *gag*: Viruscoreprotein, *Prot*: Protease, *RT*: Reverse Transkriptase und *Int*: Integrase. PBS (*primer binding site*), PPT (*polypurine tract*) und TBS (*target side duplication*) sind charakteristische Sequenzdomänen. Die Ty1-*copia*- und Ty3-*gypsy*-Elemente unterscheiden sich in der Anordnung der Gene. Die Non-LTR-Retrotransposons (LINEs) sind am 5'-Ende oft unvollständig und besitzen am 3'-Ende einen Poly-A-Schwanz. ORF1 und ORF2 überlappen.

Die genomische und chromosomale Organisation der Ty1-*copia* wurde in zahlreichen Arten, so z.B. *A. thaliana* (*Ta*, *Rtat* und *Arab*) (VOYTAS & AUSUBEL, 1988); *Nicotiana tabacum* (*Tnt1*-Elementfamilie) (GRANDBASTIEN *et al.*, 1989), und *B. vulgaris* (*Tbv*) (SCHMIDT *et al.*, 1995) untersucht. Insbesondere die Analyse der kodierenden Sequenz der reversen Transkriptase der Ty1-*copia*-Elemente wurde intensiviert, nachdem FLAVELL *et al.* (1992) aus konservierten Gensequenzen degenerierte Primer entwickelt hatten, durch die Ty1-*copia*-ähnlichen Elemente in pflanzlichen Genomen anhand eines PCR-Assays nachgewiesen werden konnten (HIROCHIKA & HIROCHIKA, 1993, BRANDES *et al.*, 1997; KUMAR *et al.*, 1997; HESLOP-HARRISON *et al.*, 1997).

Die non-LTR-Retrotransposons besitzen keine LTR-Sequenzen und werden auch als *non-viral*-Retrotransposons bezeichnet (EICKBUSH, 1992). Sie enthalten offene Leseraster, die wie auch bei den LTR-Retrotransposons für Polypeptide mit reverser Transkriptase-Aktivität kodieren. Die non-LTR-Retrotransposons werden in sog. SINEs (*short interspersed elements*) (SINGER, 1982; LENOIR *et al.*, 1997) mit Sequenzlängen von ca. 500 bp und LINEs (*long*

interspersed elements) mit einer Länge von mehreren Kilobasen und Spacersequenzen (SINGER, 1982; nach SCHMIDT, 1999) eingeteilt. Die LINEs sind im Säuger genom weit verbreitet. LINE-Familien aus der Pflanze sind beispielsweise Cin4 aus *Zea mays* (SCHWARZ-SOMMER *et al.*, 1987), Zepp aus *Chlorella* (HIGASHIYAMA *et al.*, 1997), BNR1 aus *Beta vulgaris* (SCHMIDT *et al.*, 1995; KUBIS *et al.*, 1998) und BLIN aus *Hordeum vulgare* (VERSHININ *et al.*, 2002).

Transposons der Klasse II bilden im Unterschied zu den Retrotransposons kein RNA-Intermediat und ihre Exzision und Integration erfolgt nach dem Prinzip der konservativen Transposition, d.h. das Element wird an der einen Stelle herausgelöst und taucht an einem anderen Ort im Genom wieder auf (FLAVELL *et al.*, 1994; HAGEMANN, 1999). Diese Transposition wird durch die Transposase katalysiert. Die Transposonfamilien werden nach der Sequenzhomologie ihrer internen Domäne und nach der Feinstruktur der terminalen invertierten Repeats (TIRs) differenziert. Die TIRs sind Erkennungssequenzen der Transposase und für die Transposition notwendig.

Die Kopien einzelner Sequenzfamilien besitzen eine hohe Variabilität, die wahrscheinlich durch spontane Mutation verursacht wurde (KIDWELL & LISCH, 1997). Man unterscheidet zwischen autonomen Elementen, die für die typischen Enzyme transponibler Elemente codieren, und nicht-autonomen, deletierten Sequenzen, für die angenommen wird, dass sie durch andere mobile Elemente transaktiviert und mobilisiert werden können (WALBOTT, 1999). Mit der Charakterisierung der Transposons der Klasse II auf molekularer Ebene und der molekularen Prozesse ihrer Transposition wurde zunächst beim Mais und *Antirrhinum* begonnen (nach KUNZE *et al.*, 1997; SMYTH, 1991). Die Elemente Ac-Ds (*activator-dissociation*), En/Spm (*enhancer/suppressor-mutation*) oder Mu (*mutator*) konnten im Genom von *Z. mays* identifiziert und charakterisiert werden. Die En/Spm-Elemente besitzen innerhalb ihrer TIRs das konservierte Sequenzmotiv 5'-CACTA-3'. Vertreter aller drei Transposonfamilie wurden bisher in verschiedenen Spezies nachgewiesen (nach KUNZE *et al.*, 1997).

Die Ac-Ds-Elemente werden zur Mutagenese und Genisolierung, dem sogenannten Transposon-*tagging*, eingesetzt. Dazu werden Ac-Elemente in Pflanzen eingekreuzt, die Ds-Elemente enthalten. Die Ac-Elemente initiieren Transpositionen der Ds-Elemente, die zu Mutationen führen. Dadurch können definierte Defekte oder phänotypische Veränderungen hervorgerufen werden. Durch markierte DNA-Sonden für Ds oder Ac kann sodann das Gen, in welches das Transposon integriert wurde, identifiziert und isoliert werden (*A. majus*: MARTIN *et al.*, 1985; *A. thaliana*: RAINA *et al.*, 2002).

Zu den Transposons (Klasse II-Elemente) gehören auch MITEs (*miniature inverted-repeat transposable elements*) (WESSLER *et al.*, 1996). MITEs sind kurze degenerierte Elemente, die sich nicht autonom amplifizieren können und nur geringe Homologie zu den anderen Transposonklassen aufweisen. Neuere Daten lassen vermuten, dass MITEs Derivate einer *full-length* Klasse II-Elementfamilie sind, bei denen die Transposase-kodierende Sequenzregion deletiert wurde (FESCHOTTE & MOUCHÈS, 2000).

Alle mobilen oder transponiblen genetischen Elemente im Genom führen zu einer Instabilität des Genotyps (KUMAR & BENNETZEN, 1999). Durch konservative und replikative Transposition von DNA-Elementen existiert eine Vielzahl an Möglichkeiten auf die Genomstruktur und die Genomorganisation eines Organismus einzuwirken. Mutation innerhalb von Gensequenzen oder regulatorischer Sequenzregionen können beispielsweise die Expression individueller Gene direkt beeinflussen und somit den Phänotyp von Arten verändern (BENNETZEN, 1996; KIDWELL & LISCH, 1997). Retrotransposons besitzen einen effektiven Mechanismus der Amplifikation im Genom, wodurch insbesondere die Genomgröße stark beeinflusst werden kann (XIONG & EICKBUSH, 1990; OHMIDO *et al.*, 2000). Die durch die transponiblen Elemente induzierten Mutationen führen zur Umstrukturierung von Genomen und tragen so zu einer größeren genetischen Variabilität und Heterogenität einer Art bei. Mobile DNA-Elemente könnten dadurch zu einer verbesserten Anpassungsfähigkeit der Arten auf veränderte Umweltbedingung beitragen und dadurch eine fundamentale Rolle in der Evolution und Artbildung besitzen.

Da mobile DNA-Elemente wie auch die tandemartigen repetitiven Genomkomponenten einen sehr hohen Anteil am DNA-Gehalt eines Zellkern haben können, ist die Charakterisierung und Lokalisierung dieser Sequenzklassen für das Verständnis des Aufbaus pflanzlicher Chromosomen unumgänglich. Zum Nachweis von strukturellen Prinzipien der pflanzlichen Chromosomenarchitektur ist daher weiterhin sinnvoll, zunächst eine möglichst große Anzahl an Genombestandteile in einer Spezies zu analysieren und ihre Anordnung auf dem Chromosom zu ermitteln. Ein Modell, in dem die Organisation disperser und tandemartig angeordneter repetitiver Sequenzen als auch genreicher Regionen entlang der Chromosomen zusammenfassend dargestellt ist, wurde am Beispiel der Zuckerrübe *B. vulgaris*, aus deren Genom zahlreiche Sequenzfamilien bekannt und charakterisiert sind, erarbeitet (SCHMIDT & HESLOP-HARRISON, 1998). Dieses Modell ist Grundlage für weiterführende Studien repetitiver Genomkomponenten.

1.4. Genomanalyse und Züchtung nematodenresistenter Zuckerrübenlinien

Die Zuckerrübe (*Beta vulgaris*) gehört in Europa zu den wichtigsten landwirtschaftlichen Kulturpflanzen. Sie gehört zur Familie der Chenopodiaceae und taxonomisch zur Gattung *Beta*, die in die vier Sektionen *Beta*, *Corollinae*, *Nanae* und *Procumbentes* gegliedert ist (Tab. 2; VAN GEYT *et al.*, 1990). Die Art *B. vulgaris* mit ihren mannigfaltigen Kulturformen (Zuckerrübe, Futterrübe, Mangold oder Rote Beete) wird der Sektion *Beta* zugeordnet (TRANZSCHEL, 1927; ULBRICH, 1934; LANGE *et al.*, 1999).

Tab. 2: Taxonomie, Chromosomenverhältnisse und Verbreitungsgebiet der Arten der Gattung *Beta*

Sektion	Art	2n	Verbreitungsgebiet
I	<i>Beta</i> Tranzschel		
	<i>B. vulgaris</i> L.		Küsten von Nord- und Westeuropa und des Mittelmeerraumes einschließlich Nordwestafrika und den Kanarischen Inseln
	ssp. <i>vulgaris</i>	18	
	ssp. <i>maritima</i> Arcang.	18	
	ssp. <i>adanensis</i>	18	
	<i>B. patula</i>	18	
	<i>B. macrocarpa</i>	18	
II	<i>Corollinae</i> Tranzschel		
	<i>B. corolliflora</i>	36	Hügelige und gebirgige Regionen in der Türkei, Armenien (Kaukasus) und in den benachbarten Ländern Osteuropas bis Asien
	<i>B. macrorhiza</i>	18	
	<i>B. lomatogona</i>	18	
	<i>B. trigyna</i>	54	
<i>B. intermedia</i>	45		
III	<i>Nanae</i> Ulbrich		
	<i>B. nana</i>	18	Wenige Hochgebirgslagen Griechenlands
IV	<i>Procumbentes</i> Ulbrich		
	<i>B. patellaris</i>	36	Kanarische Inseln, Küsten Nordwestafrikas
	<i>B. procumbens</i>	18	
	<i>B. webbiana</i>	18	

Das Genom von *B. vulgaris* besitzt einen diploiden Chromosomensatz ($2n = 18$) und eine relativ kleine Größe von 758 Mbp (ARUMUGANATHAN & EARLE, 1991). Daher ist *B. vulgaris* ein geeigneter pflanzlicher Modellorganismus zur Genomstrukturanalyse. Das Genom der Zuckerrübe wird deshalb, aber auch wegen ihrer Bedeutung als Kulturpflanze durch molekularbiologische Methoden seit längerem intensiv untersucht. Fünf nicht-homologe Satelliten-DNA-Familien, sowie Mikrosatelliten und Retrotransposons sind charakterisiert und lokalisiert (SCHMIDT *et al.*, 1991; 1998; SCHMIDT & HESLOP-HARRISON, 1996; KUBIS *et al.*, 1997). YAC- und BAC-Banken wurden erstellt und analysiert (KLEINE *et al.*, 1995; GINDULLIS *et al.*, 2001a). Molekulare Markersysteme durch RFLP- oder AFLP-Analysen sind erarbeitet und genetische Kopplungskarten, in denen über 900 DNA-Marker neun

Kopplungsgruppen zugeordnet werden konnten, konnten erstellt werden (PILLEN *et al.*, 1993; HALLDEN *et al.*, 1996; SCHONDELMAIER & JUNG, 1997).

Die molekulare wie auch quantitative und cytogenetische Analysen des Zuckerrübengenoms können den Züchtungsprozess von agronomisch wertvollen Zuckerrübenlinien und die gezielte Übertragung von Eigenschaften unterstützen, effizienter gestalten und optimieren. Insbesondere bei einem Transfer von Genen für Resistenzen oder Toleranzen gegenüber Schaderregern, die im Genom von Wildarten kodiert vorliegen, in die Kulturpflanze sind molekulare und cytogenetische Daten von großer Bedeutung.

Die Übertragung einer Resistenz gegen das Rübenzystenälchen *Heterodera schachtii* Sch., einen weitverbreiteten Schaderreger, ist ein bedeutendes Ziel der Zuckerrübenzüchtung. Der Nematode ist ein typischer Fruchtfolgeschädling, der hohe Ertragsausfälle (10-50% Ertragsausfall auf zentralen Flächen: Jahresbericht 2000 - Institut für Nematologie und Wirbelkunde, Münster) in Europa verursacht. Eine weitgestellte Fruchtfolge ist aus wirtschaftlichen Gründen schwer durchführbar und der Einsatz von Nematiziden ist nicht erlaubt. Für die Bekämpfung des Nematoden sind daher resistente Rübensorten unumgänglich. Resistenz gegen *H. schachtii* konnte in den Kulturformen der Sektion *Beta* nicht gefunden werden. In den drei Wildarten der Sektion *Procumbentes* (*B. procumbens*, *B. webbiana*, *B. patellaris*) wurde allerdings eine vollständige Resistenz gegen *H. schachtii* nachgewiesen (GOLDEN, 1959; KLINKE *et al.*, 1996). Durch Kreuzungen einer tetraploiden anfälligen Zuckerrübe *B. vulgaris* ssp. *vulgaris* mit der diploiden nematodenresistenten Wildrübe *B. procumbens* konnten dominante monogene Resistenzen gegen Nematoden in das Zuckerrübengenom eingeführt werden (SAVITSKY, 1975; 1978; SPECKMANN *et al.*, 1985; HEIJBOEK *et al.*, 1988). Anschließend Rückkreuzungen der triploiden Hybride mit diploiden anfälligen Zuckerrüben führten zu resistenten monosomen Additionslinien, Fragmentadditionslinien und Translokationslinien. Diese Hybride enthalten zusätzlich zum Zuckerrübengenom resistenzvermittelnde Wildrübenchromosomen, ein Wildrübenchromosomenfragment oder ein integriertes Wildrübenfragment (Translokation) (SAVITSKY, 1978; 1980; SPECKMANN *et al.*, 1985; JUNG *et al.*, 1986; JUNG & WRICKE, 1987).

Monosome Additionslinien und Fragmentadditionslinien wurden als Eltern für die weitere Züchtung eingesetzt. Weiterhin sind sie als Modelllinien zur Untersuchung chromosomaler Strukturen hervorragend geeignet, da eine Analyse des Aufbaus und des Verhaltens einzelner Chromosomen und Chromosomenfragmente im genetischen und chromosomalen Hintergrund der Kulturpflanze einfacher ist als die Untersuchung ganzer Genome. Die vergleichende

Untersuchung der Hybridlinien führt daher zu wertvollen Hinweisen auf die nukleäre Architektur der Elterngenome.

Für die Translokationslinie A906001 wurde nachgewiesen, dass das Resistenzgen *HsI^{pro-1}* dem Chromosom 1 von *B. procumbens* entstammt und endständig auf Kopplungsgruppe 4 kartiert ist (HELLER *et al.*, 1996; SCHONDELMAIER & JUNG, 1997). Aus der Linie A906001 wurde eine repräsentative YAC-Bank erstellt, aus der translokationsspezifische YACs isoliert wurden, die Insert-DNA aus dem resistenzgentragenden Chromosomenabschnitt enthielt (KLEINE, 1993; KLEINE *et al.*, 1995). Diese YACs wurden zum Sichten einer cDNA-Bank aus Wurzel-mRNA verwendet (KLEINE *et al.*, 1997) und führten zur Identifizierung des Nematodenresistenzgens *HsI^{pro-1}* durch Positionsklonierung (CAI *et al.*, 1997).

Nach mehr als drei Jahrzehnten intensiver klassischer Züchtungsarbeit sind Zuckerrüben mit Resistenz gegen *H. schachtii* jetzt bis zur Marktreife entwickelt worden. In Deutschland wurde die erste resistente Sorte im Jahre 1998 zugelassen. Durch resistente Zuckerrübensorten (z.B. Evasion, NemaKill, Nematop), die von der Firma Novatis Seeds vertrieben werden, konnte die Populationsdichte von *H. schachtii* in Feldversuchen um 60-90% gesenkt werden (Jahresbericht 2000: Institut für Nematologie und Wirbelkunde, Münster). Es handelt sich um homozygot resistente, diploide Translokationslinien, die neben der Nematodenresistenz auch noch agronomisch unerwünschte Eigenschaften der Wildrübe enthalten. Die resistenten Sorten zeigten nur auf Flächen mit hohem Nematodenbesatz deutliche Ertragsvorteile (J. MÜLLER, pers. Mitteilung).

Obwohl die aus der Kreuzung mit homozygot resistenten Bestäuberlinien hervorgegangenen Sorten theoretisch zu 100% resistent sein müssten, treten in der Nachkommenschaft 5% anfällige Pflanzen auf (J. MÜLLER, pers. Mitteilung). Ein Anteil von anfälligen Pflanzen in einer resistenten Sorte steigert die Vermehrungsrate des Nematoden und verhindert die Reduktion der Populationsdichte des Schädling. Die Ursache für diese verminderte Transmission der Resistenz ist bislang nicht geklärt. Unregelmäßigkeiten der meiotischen Teilung, wie Brückenbildung zwischen den Chromosomen und das Auftreten von Minichromosomen, die vermutlich in den späten meiotischen Stadien abgetrennt und abgebaut werden, wurden von BRANDES *et al.*, (1987) beobachtet. Vorstellbar ist, dass die Wildrüben-translokation diese Störungen verursacht und während der Gametenbildung verloren geht. Ein direkter Nachweis des Verlustes der resistenzgentragenden Chromosomenregion in der Meiose konnte aber bislang nicht erbracht werden.

1.5. Ziel der Arbeit

Nach Artkreuzungen zwischen der Zuckerrübe *B. vulgaris* und verschiedenen Wildrüben der Section *Procumbentes* wurden nematodenresistente Rübenlinien entwickelt, die zusätzlich zum Zuckerrübengenom Wildrüben-DNA enthalten. Diese Hybridlinien sind wichtiges Ausgangsmaterial für die Züchtung neuer nematodenresistenter Zuckerrübensorten.

Vergleichende strukturelle Analysen der nukleären DNA bzw. der Chromosomen in den Elternarten und den Hybridlinien führen zu einem besseren Verständnis der genetischen Organisation der Genome sowie der Vererbung von Merkmalen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollen daher repetitive und unikale Sequenzen durch cytogenetische Verfahren insbesondere der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung im Genom von nematodenresistenten Linien lokalisiert und physikalisch kartiert werden.

Durch die Untersuchungen werden folgende Ziele verfolgt:

- Mit dem Nachweis verschiedener repetitiver Sequenzklassen im Genom der Wildrübe *B. procumbens*, der Zuckerrübe *B. vulgaris* und verschiedenen nematodenresistenten Hybridlinien soll die Anordnung der Sequenzen in den Chromosomen aufgezeigt werden. Insbesondere die Feinstruktur der centromerischen und telomerischen Regionen der Elterngenome und der Aufbau der zum Zuckerrübengenom addierten, resistenzgetragenden Fragmente der Linien PRO1 und PAT2 sollen analysiert werden. Mögliche Prozesse, die zur Entstehung der Fragmentadditionslinien beigetragen haben, können anhand der Ergebnisse überprüft werden.
- Durch Lokalisierung von unikalen DNA-Sonden soll die exakte chromosomale Position des Nematodenresistenzgens *HsI^{pro-1}* und der Wildrüben-Translokation in der Translokationlinie A906001 ermittelt werden. Die Herkunft des integrierten Wildrübenchromatins soll durch vergleichende Studien an Chromosomen der monosomen Additionslinie und der Wildrübe aufgeklärt werden. Durch *in situ*-Hybridisierung translokationsspezifischer DNA-Sonden an Chromosomen verschiedener meiotischer Stadien kann das Verhalten der Translokation in der Meiose dargestellt werden. Dadurch sollen Hinweise auf die Vererbung des Resistenzgens auf die nachfolgende Generation erhalten werden.

Grundlage für die Durchführung der Analysen ist zunächst die Optimierung der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung an Chromosomen der Gattung *Beta*. Die Detektion von unikalen Sequenzen (YACs, Sequenz des Nematodenresistenzgens *HsI^{pro-1}*) an die Chromosomen von Wild- und Zuckerrübenarten muss zunächst erarbeitet werden. Hochauflösende Verfahren wie

FISH an langgestreckten Pachytänchromosomen und *fibre*-FISH sind zur physikalischen Feinkartierung von Chromosomenregionen notwendig. Sie sollen daher in der Genomanalyse der *Beta*-Arten eingesetzt werden. Durch direkte Zuordnung der molekularen Marker zu chromosomalen Regionen der *Beta*-Chromosomen sollen bisherige molekulargenetische Ergebnisse bestätigt und ergänzt werden. Die Analyse der chromosomalen Struktur durch die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung soll zum besseren Verständnis der Architektur der Zellkerne, sowie der Organisation und Evolution der Genome in der Gattung *Beta* beitragen.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.2. Chemikalien und ihre Bezugsquellen:

Substanz:	Bezugsquelle:
β-Mercaptoethanol	Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg, D
10x Klenow-Puffer	Pharmacia Biotech, Freiburg, D
10x One-Phor-All-Buffer	Pharmacia Biotech, Freiburg, D
10x Taq-Puffer	Pharmacia Biotech, Freiburg, D
1-Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid (IPTG)	Biomol, Feinchemikalien GmbH, Hamburg, D
1 kb-Leiter	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein, D
Agarose	FMC Bioproducts, Rockland, USA
Ampicillin	Biomol, Feinchemikalien GmbH, Hamburg, D
Anti-Digoxigenin-alkalische Phosphatase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
Anti-Digoxigenin-FITC	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
Bacto-Trypton	DIFCO Laboratories, Augsburg, D
Bacto-Yeastextrakt	DIFCO Laboratories, Augsburg, D
Biotin-16-dUTP	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
Blockingreagenz	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
Bromphenolblau (BPB)	Biomol, Feinchemikalien GmbH, Hamburg, D
Cellulase (<i>Aspergillus niger</i>)	Sigma, Deisenhofen, D
Cellulase (Onozuka R-10)	Serva Feinbiochemica, Heidelberg, D
Chloroform	Roth, Karlsruhe, D
Chromschwefelsäure	Merck, Darmstadt, D
Citifluor AF1	Chem. Lab. Canterbury, UK
Cytohelicase	Sigma, Deisenhofen, D
Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTP)	Pharmacia Biotech, Freiburg, D
Dextransulfat	Fluka, Serva Feinbiochemica, Heidelberg, D
DIG-High-Prime	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
DIG-Nick Translation Mix	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
Digoxigenin-11-dUTP	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
Essigsäure, 100%	Merck, Darmstadt, D
Ethanol, 100%	Roth, Karlsruhe, D
Ethidiumbromid	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Ethylendiamin-tetraacetat (EDTA)	Roth, Karlsruhe, D
Formaldehyd (37%)	Merck, Darmstadt, D
Formamid Ultra	Sigma, Deisenhofen, D
Formamid, 100%	Aldrich, Sigma, Deisenhofen, D
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	DIFCO Laboratories, Augsburg, D
Hemicellulase	Sigma, Deisenhofen, D
Heringssperma-DNA	Serva Feinbiochemica, Heidelberg, D
Hydroxychinolin	Merck, Darmstadt, D
Immersionsöl	Zeiss, Göttingen, D
KAc	Roth, Karlsruhe, D
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt, D
M13-Primer	Stratagene, Heidelberg, D
Magic Minipreps DNA Purification System	Promega Corporation, Madison, WI, USA
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	Merck, Darmstadt, D
Methanol, 100%	Merck, Darmstadt, D
MgCl ₂	Merck, Darmstadt, D

Mineralöl	Sigma, Deisenhofen, D
N,N,N,N-tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma, Deisenhofen, D
NaH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt, D
Na ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt
NaCl	Roth, Karlsruhe, D
Natriumzitat	Roth, Karlsruhe, D
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva Feinbiochemica, Heidelberg, D
4-Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
NaOH	Roth, Karlsruhe, D
Nukleotid-Mix	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
Pd(N) ₆ „random primer“	Pharmacia Biotech, Freiburg, D
Paraformaldehyd	Sigma, Deisenhofen, D
PCR-Puffer	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Pektinase (<i>Aspergillus niger</i>)	Biomol, Feinchemikalien GmbH, Hamburg, D
Phenol	Biomol, Feinchemikalien GmbH, Hamburg, D
Polyoxyethylen(20)-Sorbitanmonolaureat (Tween 20)	Sigma, Deisenhofen, D
Restriktionsenzyme	Pharmacia Biotech, Freiburg, D
Restriktionspuffer (10x One-phor-all-Puffer)	Pharmacia Biotech, Freiburg, D
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen, D
RNase A	Sigma, Deisenhofen, D
Salmon-sperm DNA	Stratagene, Heidelberg, D
Salzsäure, 100%	Merck, Darmstadt, D
Schwefelsäure, 100%	Merck, Darmstadt, D
Sephadex G-50	Pharmacia Biotech, Freiburg, D
SDS	Serva Feinbiochemica, Heidelberg, D
SeaKem Agarose	FMC Bioproducts, Rockland, USA
Streptavidin-alkalische Phosphatase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
Streptavidin-Cy3	Sigma, Deisenhofen, D
Spermidine	Sigma, Deisenhofen, D
Spermin	Sigma, Deisenhofen, D
T4 DNA Ligase 10x Puffer	Promega Corporation, Madison, WI, USA
Taq-DNA-Polymerase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
TRIS, pure, ultrapure	Biomol, Feinchemikalien GmbH, Hamburg, D
Triton X 100	Roth, Karlsruhe, D
Vectashield H-1000	Serva Feinbiochemica, Heidelberg, D
X-Gal	Roth, Karlsruhe, D
Zitronensäure	Serva Feinbiochemica, Heidelberg, D

2.1.4. Pflanzenmaterial

Das Saatgut der Futterzuckerrübensorte „Rosamona“ (Quedlinburger Saatgut GmbH) wurde kommerziell erworben. Es handelt sich hierbei um eine Hybride zwischen einer männlich sterilen Zuckerrübe als weiblichen Elter und einer Futterrübe als Pollenspender (FISCHER, 1989).

Die in Tabelle 3 aufgeführten monosomen Additionslinien und Fragmentadditionslinien, die zusätzlich zum Zuckerrübengenom ein resistenzvermittelndes Chromosom oder Chromosomenfragmente einer Wildrübe der Sektion *Procumbentes* enthalten, wurden für die Untersuchungen eingesetzt (JUNG *et al.*, 1992; JUNG & WRICKE, 1987). Saatgut der Translokationslinie A906001, bei der infolge einer Rekombination Wildrübenchromatin in ein Zuckerrübenchromosom integriert ist, wurde freundlicherweise von der Firma Saatzucht A. Diekmann-Heimburg, Sülbeck zur Verfügung gestellt.

Tab. 3: Übersicht über nematodenresistente Zuckerrübenlinien

Kielcode	Wildrübenherkunft	2n	weitere Bezeichnungen
950039	<i>B. procumbens</i> ; Chromosom 1	18+1	a-Typ (JUNG & WRICKE, 1987)
930285	<i>B. webiana</i> ; Chromosom 1	18+1	a-Typ (JUNG & WRICKE, 1987)
930269	<i>B. webiana</i> ; Chromosom 7	18+1	b-Typ (JUNG & WRICKE, 1987)
930279	<i>B. webiana</i> ; Chromosom 8	18+1	c-Typ (JUNG & WRICKE, 1987)
930143	<i>B. procumbens</i>	18+Fragment	PRO1 (JUNG & WRICKE, 1987)
940070	<i>B. patellaris</i>	18+Fragment	PAT2 (BRANDES <i>et al.</i> , 1987)
940043	<i>B. procumbens</i> ; Chromosom 1	18	A906001 (Dieckmann-Heimburg)

Das Saatgut der Wildrübenarten der Sektionen *Beta*, *Corollinae* und zwei Arten der Sektion *Procumbentes* der Gattung *Beta* wurde von Dr. L. Frese (Institut für Pflanzenbau der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft, Braunschweig-Völkenrode) zur Verfügung gestellt. *Beta nana* (81FD26) und *Beta webbiana* (B 602) wurden von Dr. B. Ford-Lloyd (University of Birmingham/England) abgegeben.

Die monosomen *Beta vulgaris* x *Beta corolliflora* Additionslinien ($2n = 2x = 18+1$), sowie eine amphitriploide Hybride *Beta vulgaris* x *Beta corolliflora* ($2n = 3x = 18+9 = 27$) wurden von Prof. Guo Dedong aus dem Institute of Biotechnology, Heilongjiang University Harbin (VR China) hergestellt und von Dongjie Gao (Universität Kiel) freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

2.1.3. DNA-Sonden

Für die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) wurden die in Tabelle 4 aufgeführten DNA-Sonden verwendet.

Tab. 4: DNA-Sonden für die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH)

DNA-Sonde EMBL	Herkunft	Länge	Zielsequenz	Referenz
pTA71	<i>Triticum aestivum</i> L.	9 kb	18S-5,8S-25S rRNA-Gene terminal auf Chromosom 1	GERLACH & BEDROCK, 1979
p18S	<i>B. vulgaris</i> L.	380 bp	Fragment der 18S rRNA-Gensequenz	T. SCHMIDT, unveröffentlicht
ITS1		400 bp	intern transkribierte Spacer der 18S-5.8S-25S-rRNA-Gene: ITS1	Primer zur Verfügung gestellt von: Dr.R.L. Doudrick/USDA Forest Service, Saucier (USA)
pXV1 Z25803	<i>B. vulgaris</i> L.	349 bp	5S rRNA-Gene; perizentromerisch auf Chromosom 4	SCHMIDT <i>et al.</i> , 1994
pBV1 Z22849	<i>B. vulgaris</i> L.	327 bp	perizentromerisches Satellitenrepeat in <i>B. vulgaris</i>	SCHMIDT & METZLAFF, 1991
pLT11	<i>Arabidopsis thaliana</i> L.		Telomersequenz	RICHARDS & AUSUBEL, 1988
pAV34 AJ242669	<i>B. corolliflora</i>	363 bp	subtelomerisches Satellitenrepeat	JANSEN, 1999
pAN163 AJ242691	<i>B. corolliflora</i>	230 bp	interkalares Satellitenrepeat	JANSEN, 1999
pEV1 Z22848	<i>B. vulgaris</i>	160 bp	interkalares Satellitenrepeat in <i>B. vulgaris</i>	SCHMIDT <i>et al.</i> , 1996
pTS5 Z50809	<i>Beta procumbens</i>	160 bp	perizentromerischer Satellitenrepeat in <i>Procumbentes</i>	SCHMIDT & HESLOP-HARRISON, 1996
pTS4.1 Z50808	<i>B. procumbens</i>	312 bp	perizentromerischer Satellitenrepeat in <i>Procumbentes</i>	SCHMIDT & HESLOP-HARRISON, 1996
pBP10 AJ278752	<i>B. procumbens</i>	417bp	Fragment des Reverse Transkriptase Gens von Ty3-gypsy-Retrotransposons	GINDULIS <i>et al.</i> , 2001b
YAC120	<i>B. procumbens</i> A906001	120 kb		KLEINE <i>et al.</i> , 1995
YAC128	<i>B. procumbens</i> A906001	280 kb		KLEINE <i>et al.</i> , 1995
<i>HsI</i> ^{pro-1} Klon 1832	<i>B. procumbens</i> A906001	684 bp	interne Sequenz des Nematodenresistenzgens	CAI <i>et al.</i> , 1997

2.1.4. Wirts-Vektor-Systeme

Für die Klonierung von PCR-Produkten wurde das pGEM-T Easy Vector System (Promega) eingesetzt. Die *EcoRV*-Schnittstelle und das 3' terminal überhängende Thymidin des

pGEM-T Vektors gewährleistet eine effiziente Ligation von PCR-Produkten, da eine Selbstligation des Vektors verhindert wird.

Als Wirtsbakterium für die Transformation diente *Escherichia coli* DH5 α .

2.1.5. Standardpuffer und Lösungen

Fixierlösung (Fixativ):	3 Teile Methanol (100%) 1 Teil Essigsäure (100%) stets frisch ansetzen
TE-Puffer:	Tris/HCl pH 8,0 10 mM EDTA 1 mM
TNE-Puffer:	NaCl 100 mM Tris/HCl pH 8,0 10 mM EDTA 1 mM
20x SSC:	NaCl 3 M Natriumzitat 0,3 M pH 7,0
4xSSC/Tween:	4x SSC mit 0,2% Tween 20
McIlvaine-Puffer:	Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O 164 mM Zitronensäure 8 mM pH 7,0
DAPI-Lösung:	Stammlösung von 100 μ g/ml in H ₂ O (Lagerung bei -20°C) Arbeitslösung: 2 μ g/ml in McIlvaine-Puffer

2.1.6. Nährmedien und Antibiotika

Alle Angaben pro Liter

2 YT-Flüssigmedium:	Bacto-Trypton 16 g Hefeextrakt 10 g NaCl 5 g
LB-Flüssigmedium:	Bacto-Trypton 10 g Hefeextrakt 5 g NaCl 10 g
LB-Agar:	LB-Flüssigmedium + 15 g Agar
Indikatorplatten:	LB-Agar IPTP 0,5 mM X-Gal 0,004%
Antibiotikum:	Ampicillin 100 μ g/ml Nährmedium

2.2. Methoden

2.2.1. Pflanzenanzucht

Die Anzucht der Pflanzen von *B. vulgaris* konnte durch direkte Aussaat in die Erde erfolgen. Eine Vorbehandlung des Saatgutes war nicht erforderlich.

Die Keimfähigkeit des Wildrübensaatgutes war aufgrund einer starken Verkieselung des Perikarps sehr gering. Zur Unterstützung der Keimung wurde eine einstündige Vorbehandlung mit konzentrierter Schwefelsäure durchgeführt. Nachdem die Samenknäuel anschließend unter fließendem Wasser gründlich gewaschen und mit Hilfe eines Skalpells angeritzt worden waren, wurden sie auf feuchtem Filterpapier ausgelegt und in Petrischalen in einem Inkubator bei 24°C gekeimt. Nach ca. 10 Tagen wurden die Keimlinge in Einheitserde gepflanzt. Die weitere Aufzucht erfolgte im Gewächshaus. Für die Anzucht der Pflanzen von *B. nana* war eine Sterilisierung des Saatgutes mit 4% Kalziumhypochlorid (10 min; gefolgt von intensivem Waschen mit Wasser) und die Verwendung von autoklavierter Erde notwendig.

2.2.2. Nematodentest

Um resistente und anfällige Zuckerrüben zu unterscheiden, wurden sämtliche Pflanzen im Gewächshaus einem Nematodentest (TOXOPEUS & LUBBERTS, 1979) unterzogen. Zur Gewinnung von infektiösen Nematodenlarven wurden Zysten des Nematoden *Heterodera schachtii* Schm. von den Wurzeln befallener, anfälliger Zuckerrüben gewaschen, in einem Schlupftrichter mit 3M Zinkdichlorid-Lösung ($ZnCl_2$) überführt und für sieben Tage bei Raumtemperatur inkubiert. Die zu testenden Pflanzen wurden einzeln in Quarzsand kultiviert und mit den geschlüpften L₂-Larven (Larvalstadium 2) inokuliert (600 Larven pro Pflanze). Um die Auswaschung der Nematoden zu verhindern, wurden die frisch inokulierten Pflanzen zwei Tage nicht gegossen.

Nach einer vierwöchigen Inkubationszeit wurden die Pflanzen bonitiert. Dazu wurde der Quarzsand vorsichtig von den Wurzeln entfernt, so dass die Zystenanzahl je Wurzel bestimmt werden konnte.

Der Nematodenbefall wurde in zwei Klassen unterteilt:

I: 0-5 Zysten resistent

II: > 5 Zysten anfällig

2.2.3. Molekularbiologische Standardmethoden

2.2.3.1. DNA-Präzipitation mit Ethanol

Zunächst wurde die Konzentration der Kationen in der DNA-Lösung mit 3 M Na-Acetat (pH 5,2) Lösung auf 0,3 M eingestellt. Die Lösung wurde mit 2 Vol -20°C kaltem Ethanol versetzt und gemischt. Die Präzipitation erfolgte 30 min bei -70°C oder ü.N. bei -20°C. Die DNA wurde durch 15 min Zentrifugation bei 4°C und 10000xg pelletiert. Anschließend

wurde 1x mit eiskaltem 70%-igem Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet wurde abschließend bei Raumtemperatur getrocknet.

2.2.3.2. Präparation pflanzlicher Gesamt-DNA

Die Präparation pflanzlicher Gesamt-DNA aus Blattmaterial erfolgte nach der Methode von JUNGHANS & METZLAFF (1988). Etwa 5 g frisches Blattmaterial wurde kurz mit destilliertem Wasser gespült, abgetrocknet und in flüssigem Stickstoff gemörsert. Das fein zerstoßene Gewebe wurde in 15 ml Extraktionspuffer überführt. Nach Zugabe von 3 ml 10% SDS (SDS-Endkonzentration: 3.3%), erfolgte eine Inkubation für 20 bis 60 min unter leichtem Schwenken bei 37°C. Nach vorsichtigem Mischen mit 9 ml Phenol/TE folgte eine 10 minütige Zentrifugation bei 3100 rpm (Megafuge R, Heraeus Sepatech) und 4°C. Im Anschluß wurde eine Proteinextraktion der wässrigen Phase durch Ausschütteln mit 0,5 Vol. Phenol/TE und 0,5 Vol. Chloroform und eine Zentrifugation wie oben durchgeführt. Die wässrige Phase des Überstandes wurde mit 1 Vol. Chloroform ausgeschüttelt und erneut zentrifugiert. Die Fällung der Nukleinsäuren erfolgte mit 1 Vol. eiskaltem Isopropanol (100%). Durch mehrmaliges Kippen und Drehen des Reaktionsgefäßes wurde die hochmolekulare DNA verknäult. Dieses Präzipitat wurde abgenommen, in 70%-igem Ethanol gespült und in 0,5 ml TNE-Puffer gelöst.

Die Entfernung der RNA erfolgte durch einstündige Inkubation mit RNase A bei 37°C und anschließender Fällung der DNA mit 2,5 Vol. eiskaltem Ethanol (100%) bei -20°C. Daraufhin wurde die DNA durch Zentrifugation wie oben sedimentiert, das Pellet mit 70%-igem Ethanol gespült, getrocknet und in einem geeigneten Volumen TE-Puffer aufgenommen. Die Qualität und die Konzentration der extrahierten DNA wurde durch Restriktion (Kap.2.2.3.4.) und Auftrennung eines Aliquots in einem Agarosegel (Kap.2.2.3.3.) überprüft. Die Lagerung der DNA erfolgte wahlweise bei -20°C oder bei 4°C.

Extraktionspuffer:

NaCl	100 mM
EDTA	50 mM
Tris/HCl pH 7,5	50 mM
β-Mercaptoethanol	10 mM

Phenol: Phenol gesättigt mit TE-Puffer, pH 8,0

Chloroform: Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch 24:1

2.2.3.3. Gelelektrophorese von DNA

Die DNA-Proben wurden mit 0,1 Vol. Beladungspuffer versetzt und auf ein 0,9-1,3%iges horizontales Agarosegel in 1x TAE-Puffer aufgetragen. Die Agarosekonzentration richtete sich nach der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes konnten die DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Zur Größenbestimmung der Fragmente wurde zusätzlich ein DNA-Größenstandard (z.B. 1kb-Leiter, Gibco) aufgetragen.

Zur Anfärbung der DNA-Banden wurde das Agarosegel mit 0,5 µg Ethidiumbromid/ml versetzt. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und fluoresziert bei Anregung mit UV-Licht ($\lambda = 312 \text{ nm}$). DNA-Banden sind so auf dem UV-Transilluminator sichtbar und können fotografisch festgehalten werden.

50x TAE-Elektrophoresepuffer:

Tris-Acetat, pH 8,0	2 M
EDTA	0,05 M

Eine Verdünnung zu 1x TAE-Puffer erfolgte mit H₂O.

Beladungspuffer:

EDTA	100 mM
Glycerol	40%
SDS	0,1%
Bromphenolblau (w/v)	0,1%
Xylencyanol (w/v)	0,1%

2.2.3.4. DNA -Restriktion

Die Aktivität der Restriktionsendonukleasen (U) ist bezogen auf die Menge an Restriktionsenzym, die benötigt wird, um 1 µg Lambda-DNA in einer Stunde zu spalten. Der Reaktionsansatz wurde entsprechend den Herstellerangaben aus destilliertem Wasser, Reaktionspuffer, genomische DNA und Restriktionsenzym gemischt und im Temperaturoptimum des verwendeten Enzyms für einige Stunden inkubiert.

Restriktionsansatz:

x µg	DNA
2,5 µl	geeigneter 10x Puffer
3x U	Restriktionsendonuklease
y µl	H ₂ O
<hr/>	
Σ 25 µl	

Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 0,1 Vol. Beladungspuffer (Kap.2.2.3.3.) beendet. Anschließend wurde ein Aliquot im Agarosegel analysiert (Kap.2.2.3.3.).

2.2.3.5. Rückgewinnung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel

Von der restringierten, in einem Agarosegel aufgetrennten DNA wurden DNA-Banden mit einem Skalpell herausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt.

Für die Aufreinigung der DNA aus dem Gelstück wurde der „Sephaglas™ Band Prep Kit“ von Pharmacia Biotech verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

2.2.3.6. Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation wurden die PCR-Amplifikate zunächst durch das „Wizard® PCR Preps DNA Purification System“ (Promega) aufgereinigt.

Da die in der PCR-Reaktion eingesetzte thermostabile Polymerase (Taq-Polymerase) am 3'-Ende des PCR-Produkts *template*-unabhängig ein zusätzliches Desoxyadenosin anfügt, wurde für die Klonierung der PCR-Produkte der pGEM®-T Easy Vektor (Promega)

verwendet. Der pGEM[®]-T Easy Vektor ist nur geeignet für DNA-Fragmente mit überhängendem Adenosinrest, da nach Spaltung des Vektors mit *EcoRV* an beiden 3'-Enden der Klonierungsstelle ein terminales Thymidin eingefügt wurde. Durch das terminale überhängende Thymidin wird die Rezirkulation des Vektors verhindert und die Effizienz der Ligation wesentlich gesteigert. Für die Ligation wurde gemäß den Herstellerangaben der T4 DNA-Ligase 10x Puffer, die T4 DNA-Ligase (Promega), das PCR-Produkt und das destillierte Wasser zusammengegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert.

2.2.3.7. Herstellung kompetenter Zellen

Für die Herstellung kompetenter Zellen wurden 3 ml 2 YT-Medium (Kap.2.1.6.) mit einer *E.coli*-DH 5 α -Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler (Certomat[®], B. Braun Biotech International) bei 220 rpm inkubiert. Damit wurden dann 500 ml LB-Medium beimpft und bei 37°C inkubiert, bis die optische Dichte ($\lambda = 450$ nm) einen Wert von 0,6 erreicht hatte. Die Bakteriensuspension wurde schnell auf Eis abgekühlt und unter der Sterilbank auf zwei 250 ml Plastikgefäße verteilt. Die Suspension wurde anschließend 10 min bei 5000 rpm (Beckman-Zentrifuge, Rotor A 6,9) zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und verworfen. Das Sediment wurde in 50 ml kalter 0,1 M MgCl₂-Lösung resuspendiert und in 50 ml Gefäße und 5 min bei 5000 rpm (Beckman-Zentrifuge, Rotor A 6.14) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 50 ml kalter 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert. Nach einer halbstündigen Inkubation auf Eis wurde der Ansatz erneut 5 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Das Sediment wurde dann in 10 ml 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert mit 7 ml sterilem Glycerin vermischt. Unter der Sterilbank wurde die Suspension aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die kompetenten Bakterien können bei -70°C gelagert werden, bevor sie für eine Transformation eingesetzt werden.

2.2.3.8. Transformation von Plasmid-DNA in Wirtsbakterien

Für die Transformation wurden 200 μ l der kompetenten Zellen des *E.coli*-Stammes DH5 α (Kap.2.2.3.7.) auf Eis aufgetaut. 10 μ l des Ligationsansatzes (Kap.2.2.3.6.) wurden zu den Zellen gegeben, gemischt und 0,5-1 h auf Eis inkubiert. Nach Erwärmen des Ansatzes auf 42°C für 90 sec oder 3x 30 sec wurde die Bakterienzellwand für die DNA permeabel (Hitzeschock). Danach wurde der Ansatz sofort auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 800 μ l gekühltem 2 YT-Medium (Kap.2.1.6.) wurden die Zellen 1 h bei 37°C inkubiert. Dann wurde bei 2500 rpm zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Sediment wurde in 400 μ l gekühltem 2 YT-Medium resuspendiert und auf Indikatorplatten (Kap.2.1.6.) mit Ampicillin (100 μ g/ml) ausplattiert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C über Nacht. Nach einigen Stunden Lagerung bei 4°C konnte eine Blau/Weiss-Selektion durchgeführt werden.

2.2.3.9. Anlegen einer Stammkultur

Überimpfen einer Einzelkolonie eines Bakterienstammes in 3 ml 2 YT-Medium (Kap.2.1.6.) mit 300 μ g Ampicillin und Inkubation über Nacht auf einem Schüttler bei 220 rpm und 37°C. Von dieser Übernachtskultur wurden 850 μ l Bakteriensuspension abgenommen und mit 150 μ l sterilem Glycerin (100%) versetzt. Das Gemisch wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

2.2.3.10. Isolierung bakterieller Plasmid-DNA

Zur Präparation bakterieller Plasmid-DNA wurden je nach Verwendungszweck zwei verschiedene Methoden verwendet. Für die Kontrolle der Bakterienklone war die kostengünstigere Schnellanalyse nach HOLMES & QUIGLEY (1981) ausreichend. Eine sauberere Präparation für die Sequenzierung und die PCR erfolgte durch das „Magic™ Minipreps DNA Purification System“ von Promega.

Plasmid-Minipräparation (Schnellanalyse)

Es erfolgte eine Zentrifugation von 1,5 ml Übernachtskultur bei 10000xg über 20 sec. Das Sediment wurde in 200 µl STM resuspendiert. Nach Zugabe von 20 µl Lysozym (10 mg/ml) wurde erneut gemischt und der Ansatz 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden Proteine bei 100°C im Wasserbad denaturiert (40 sec) und die Plasmid-DNA freigesetzt. Nach 15 minütiger Inkubation auf Eis wurde 15 min bei 10000xg zentrifugiert. Das erhaltene Proteinpellet wurde mit einer Pipette entfernt. Zur Fällung der DNA wurden 80 µl eiskaltes Isopropanol zu dem Überstand gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer 10 minütigen Zentrifugation bei 10000xg wurde der Überstand entfernt und das Sediment zweimal mit 80%igem Ethanol gewaschen. Das bei Raumtemperatur getrocknete Sediment wurde in 75 µl 1x TE-Puffer (Kap.2.1.5.) gelöst und bei 4°C gelagert.

Saccharose-Triton-Medium (STM):

Saccharose	8%
Triton X 100	5%
EDTA	50 mM
TRIS	50 mM

Der pH-Wert wurde mit 1 N HCl auf 8,0 eingestellt

Präparation hochreiner Plasmid-DNA

Die Plasmid-Minipräparation wurde mit dem „Magic™ Minipreps DNA Purification System“ von Promega (A7100) durchgeführt, dessen Grundlage die alkalische Lyse der Bakterienzelle ist (SAMBROOK *et al.*, 1989). Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgte nach Herstellerangaben.

2.2.3.11. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Durch PCR (*polymerase chain reaction*) ist es möglich, eine DNA-Sequenz bis zu einer Länge von 4 kb spezifisch und direkt exponentiell zu vervielfältigen. Eine thermostabile DNA-Polymerase (*Taq*-DNA-Polymerase, Roche), die aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert wurde, und zwei spezifische Oligomerprimer werden für eine PCR eingesetzt. Die *Taq*-DNA-Polymerase besitzt eine 5'→3'-Polymerase, deren Aktivität bei 72°C ihr Maximum erreicht. Bei klonierten DNA-Sequenzen wurden Primer eingesetzt, die die Fremd-DNA flankieren. Die Reaktion besteht aus Denaturierung (92°C), Anlagerung der Primer an die einzelsträngige DNA und DNA-Synthese. Diese drei Schritte werden 35 mal wiederholt und die Originalmatrize dadurch stark vervielfältigt.

PCR-Ansatz:

PCR-Puffer (mit 1,5 mM MgCl ₂)	1x
Primer	100 pmol
dNTP-Mix (2,5 mM pro Nukleotid)	0,2 mM
DNA	50-100 ng
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	,5 U
H ₂ O	ad 50 µl

Programmablauf:

5,0 min	94°C		
0,5 min	94°C	Denaturierung	} 35x
0,5 min	56°C	Primeranlagerung	
1,5 min	72°C	Extension	
5,0 min	72°C		
∞	4°C		

Primersequenzen, die nicht im Ergebnissteil aufgeführt wurden:

ITS5 : GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG
 ITS2 : GCTCGCGTTCTTCATCGATGC
 1832D: CGAATAAGTGAGAGGATC
 1832H: GGCACCATCCAAACTCGG
 1832B: GCAATATTCCCCTAAAT
 1832T:CTATGCTCGAGTGTGGGTATAGTT

2.2.3.12. Southern-Transfer

Bei dem Southern-Transfer (SOUTHERN, 1975) wurden die zuvor gelelektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmente auf eine positiv geladene Nylonmembran (HybondTM-N⁺, Amersham) übertragen. Die nachfolgende Hybridisierung mit markierten DNA-Proben erlaubte die Identifizierung spezifischer DNA-Fragmente bzw. Fragmentmuster. Die DNA-Fragmente wurden zunächst auf einem UV-Transilluminator durch dreiminütige Bestrahlung (Wellenlänge 306 nm) depurinieren. Dies führt zu Einzelstrangbrüchen der DNA und erleichterte die spätere Übertragung auf die Membran. Während des 16 -bis 24-stündigen Transfers erfolgte die Denaturierung der DNA.

Transfer-Lösung:

NaOH	0,5 M
NaCl	1,5 M
pH 7,0	

Neutralisierungslösung:

NaCl	3,0 M
Tris	0,5 M
pH 7,0	

2.2.3.13. Radioaktive DNA-Markierung und Hybridisierung

Mit Hilfe der Random Priming Markierungsmethode wurden radioaktive Nukleotide in die Sonden eingebaut (FEINBERG & VOGELSTEIN, 1983). Die Sonden wurden mit α -³²P-dATP und α -³²P-dCTP markiert. Das Endvolumen der Reaktionsansätze betrug 100 μ l. Diese wurden für 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend von den nicht eingebauten Nukleotiden über eine Sephadex-G-50-Säule (Pharmacia Biotech) getrennt. Vor der Hybridisierung wurden die Sonden durch 5-minütige Inkubation bei 100°C in Einzelstang-DNA überführt.

Die Membranen wurden zur Absättigung freier, unspezifischer Bindungsstellen für 3-5 h bei 60°C mit 10 mg/ml Heringssperma-DNA in Vorhybridisierungslösung inkubiert. Anschließend wurden die Membranen mit den markierten Sonden in Glasröhren überführt. Die Hybridisierung wurde bei 60°C im Hybridisierungsöfen (Drehinkubator; Bachhofer, Reutlingen) für 24 h durchgeführt. Dabei wurden die Membranen durch Rotation gleichmäßig mit der Lösung benetzt.

Zur Entfernung unspezifisch gebundener DNA wurden die Membranen anschließend zweimal mit Waschlösung I für 30 min bei 60°C gewaschen. Danach wurden sie in einen Folienschlauch eingepackt und mit einem doppelt beschichteten Röntgenfilm (Hyperfilm-MP, Amersham, Braunschweig) in einer Expositionskassette mit Verstärkerfolie (CORONEX) bei -70°C exponiert. Die Expositionszeit betrug, je nach Aktivität der markierten Sonde, wenige Stunden bis mehrere Tage.

Markierungsansatz:

Sonden-DNA (20-40 ng)	20 μ l
dGTP, dTTP-Mix (0,5 mM)	4 μ l
Oligo-(dNTP) ₆ (50 U/ml)	10 μ l
Klenow-Puffer (10x)	10 μ l
Klenow-Enzym (1 U/ μ l)	2 μ l
α - ³² P-dATP (40 μ Ci)	1,5 μ l
α - ³² P-dCTP (40 μ Ci)	1,5 μ l
H ₂ O	51 μ l
	Σ 100 μ l

10x Klenow-Puffer:

Tris/HCl pH 7,2	500 mM
MgCl ₂	100 mM
DTE	1 mM
BSA	2 mg

20x SSPE:

Na ₂ HPO ₄	0,2 M
NaCl	3 M
EDTA	20 mM

100x Denhardt-Lösung:

Polyvinylpyrrolidon	2% (w/v)
BSA	2% (w/v)
Ficoll Typ 400	2% (w/v)

Vorhybridisierungslösung:

SSPE	5% (w/v)
SDS	0,2% (w/v)
Denhardt-Lösung	5% (w/v)

Waschlösung I:

SSC	0,5x
SDS	0,2% (w/v)

Waschlösung II:

SSC	1x
SDS	0,2% (w/v)

2.2.3.14. Sequenzierung von DNA

Das hier verwendete Sequenzierungsprotokoll basiert auf der Kettenabbruchmethode durch den Einsatz von 2',3'-Dideoxynukleotiden (SANGER *et al.*, 1977). Eine Matrizen-DNA wurde in einer *cycle sequencing*-PCR amplifiziert, wobei die DNA-Synthese des neuen Stranges durch den zufälligen Einbau von Dideoxynukleotiden gestoppt wurde. Die Auftrennung und Detektion der DNA-Fragmente erfolgte am LI-COR® DNA Sequencer 4000 mittels eines Polyacrylamidgels. Es wurden M13 Universalprimer verwendet, die Fluoreszenz-(IRD800)-markiert vorlagen.

Für die Sequenzierungsreaktion wurde der „*SequiTherm EXCEL™ Long Read™ DNA Sequencing Kits-LC*“ (Biozym) verwendet. Der Sequenzierungsansatz musste zunächst auf 200 fmol Plasmid-DNA und 2 pmol Fluoreszenz-markierte M13-Primer eingestellt werden. Die Auftrennung erfolgt in einem 7%igen Polyacrylamidgel, das eine Dicke von 0,25 mm besaß und zwischen zwei 30x 40 cm großen Glasplatten gegossen wurde.

Polyacrylamidgel:

TBE-Puffer	1x
Long Ranger	7%
Harnstoff	7 M

TBE-Puffer (10x):

Tris/HCl pH 7	1,34 M
EDTA	25 mM
Borsäure	450 mM
dest. Wasser	ad 1 l

Die Sequenzgellösung (35 ml) wurde direkt vor dem Gießen des Gels mit 350 µl DMSO, 35 µl TEMED und 245 µl APS (10%) vermischt und anschließend filtriert (Filtropur S, pyrogenfrei, 0,45 µm Porendurchmesser; Sarstedt, Nümbrecht). Nach etwa zwei Stunden war das Gel polymerisiert. Als Laufpuffer wurde TBE, pH 7 (1x) verwendet. Vor dem Auftragen der denaturierten Proben erfolgte ein Vorlauf von 30 min.

Die Laufbedingungen am LI-COR® DNA-Sequencer 4000 waren wie folgt:

Parameter	
Spannung	1500 V
Stromstärke	35 mA
Temperatur	45°C
elektr. Leistung	50 W
<i>frames</i>	40
<i>scan speed</i>	3
Bildauflösung	16 bits

M13 Primer:

M13-Forward Primer: 5'-CACGACGTTGTAAAACGAC-3'

M13-Reverse Primer: 5'-GGATAACAATTCACACAGG-3'

Der Ansatz wurde auf Eis gemischt:

<i>SequiTerm</i> EXCEL II Sequencing Buffer	7,2 µl
DMSO	0,7 µl
M13 Primer	2,0 µl
Template-DNA	100-350 fmol
ad 16 µl mit deionisiertem Wasser	
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5 U/µl)	1,0 µl

Der gut durchmischte Ansatz wurde auf vier gekennzeichnete 0,5 µl-Gefäße (A,T,G,C) verteilt und der dNTP/ddNTP-Mix wie folgt dazugegeben:

A	2 µl A-Mix
T	2 µl T-Mix
G	2 µl G-Mix
C	2 µl C-Mix

Für die anschließende PCR im Thermocycler (Gene Amp PCR System 9600 Perkin Elmer) wurde folgendes Programm verwendet:

30 sec 94°C			
30 sec 94°C	Denaturierung	}	28x
30 sec 56°C	Primeranlagerung		
60 sec 70°C	Extension		
10 sec 94°C		}	10x
30 sec 70°C			
∞	4°C		

Durch Zugabe von 3 µl Beladungspuffer (Kap.2.2.3.3.) zu jedem Ansatz wurde die Reaktion gestoppt.

Bevor die Beladung des denaturierenden Sequenzierungsgels mit jeweils 1 µl eines Ansatzes pro Tasche erfolgte und die Elektrophorese durchgeführt wurde, wurden die Ansätze für 3 min bei 94°C denaturiert. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Daten mit dem Softwareprogramm „DNA 4200“ ausgewertet.

2.2.3.15. Sequenzauswertung

Die Sequenzdaten, die nach der elektrophoretischen Auftrennung gewonnen wurden, wurden mit den Programmen „DNASar“ und „DNASIS for Windows V2.5“ bearbeitet und ausgewertet.

Homologie und Divergenz zwischen Sequenzen wurden durch das Programm „CLUSTAL W“ (Version 1.7) ermittelt. Die durch „CLUSTAL W“ errechneten und in „PHYLIP *style*“ gespeicherten Daten konnten durch ein weiteres Programm „Tree View (Win32) 1.4“ als phylogenetische Stammbäume dargestellt werden.

Über das Internet sind Sequenzdatenbanken (Genbank, EMBL) zugänglich, die eine Homologiesuche zu in den Datenbanken abgelegten Sequenzen ermöglichen. Mit den ermittelten Nukleotidsequenzen wurde ein Homologievergleich in der EMBL-Datenbank mit den Suchprogrammen „Fasta3“ (<http://www2.ebi.ac.uk/fasta3>) und „Blastn“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/>) durchgeführt (ALTSCHUL *et al.*, 1990).

2.2.4. Markierung von DNA-Sonden für die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung

Es wurden unterschiedliche Verfahren zur Markierung von DNA-Sonden für die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung eingesetzt. Repetitive Sequenzen wurden mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in Anwesenheit von Biotin-16-dUTP, Digoxigenin-11-dUTP oder Rhodamin-4-dUTP (FluoroRed) amplifiziert und als Sonden für die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung verwendet. YAC-DNA wurde durch DOP-PCR (*degenerate oligonucleotide primer* PCR; TELENUS *et al.*, 1992) und genomische DNA durch Random Priming oder Nick-Translation mit Biotin-16-dUTP oder Digoxigenin-11-dUTP markiert.

2.2.10.1. Sondenmarkierung mit Polymerase-Kettenreaktion

Die Sondenmarkierungen wurden mit den Primern M13 Universal-Primer und M13 Reverse-Primer durchgeführt, welche die Polylinkerregion des Vektors pUC18, in dem die

Sonden kloniert wurden, flankieren. Nachdem die Ansätze gemischt worden waren, wurden sie mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet und im DNA Thermal Cycler 480 (Perkin Elmer Cetus) inkubiert.

Ein typischer PCR-Ansatz für eine DNA-Markierung enthält:

PCR-Puffer (mit 1,5 mM MgCl ₂)	1x
M13 Primer	100 pmol
dNTP-Mix (2,5 mM pro Nukleotid)	0,2 mM
DNA	50-100 ng
Hapten-gekoppelte Nukleotide	s. u.
<i>Taq</i> -Polymerase	2,5 U
H ₂ O ad 50 µl	

Je 50 µl Ansatz wurden eingesetzt:

Rhodamin-4-dUTP (FluoroRed) (1 mM)	2,00 µl
oder	
Digoxigenin-11-dUTP (1 mM)	1,75 µl
oder	
Biotin-16-dUTP (0,3 mM)	3,00 µl

Da markierte DNA im Agarosegel langsamer als unmarkierte DNA wandert, ist eine Kontrolle der Markierungseffizienz durch Gelelektrophorese (Kap.2.2.3.3.) möglich. Dazu wurden 1 µl des PCR-Reaktionsansatzes mit markierter DNA und als Kontrolle 1 µl eines PCR-Ansatzes ohne Zugabe von Hapten-gekoppelten Nukleotiden in benachbarten Gelspuren elektrophoretisch aufgetrennt. Bei einer effizienten Markierung ist ein deutlicher Unterschied in den resultierenden Lauflängen zu beobachten. Bei Digoxigenin-markierten DNA-Sonden ist die Lauflängendifferenz zu unmarkierten DNA größer als bei Biotin-markierten DNA-Sonden.

Die markierten DNA wurde mit Ethanol präzipitiert (Kap.2.2.3.1). Das DNA-Pellet wurde getrocknet, in 20 µl sterilem H₂O resuspendiert und bei -20°C gelagert.

2.2.10.2. DOP-PCR (*degenerate oligonucleotide-primed PCR*)

Bei der DOP-PCR (TELENIUS *et al.*, 1992) wird ein degenerierter Primer 6-MW (5'-CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG-3') eingesetzt. Der Primer enthält 3 spezifische Basen am 3'-Ende und eine *NotI*-Restriktionsschnittstelle am 5'-Ende. Die Amplifikationschritte sind in 2 Stufen eingeteilt. Zunächst werden 5 Zyklen bei einer geringen Stringenz (*annealing temperatur*, T_a = 30°C) durchgeführt. Durch seine kurze spezifische Sequenz am 3'Ende und der zentralen Kasette mit den degenerierten Nukleotiden wird zunächst eine häufige Anlagerung des DOP-Primers ermöglicht. Ein Pool von sehr unterschiedlichen Sequenzen entsteht, welcher statistisch die als Sonde verwendete genomische DNA repräsentiert.

Während der zweiten Stufe wird die *annealing*-Temperatur auf 60°C erhöht. Das erlaubt die Amplifikation nur nach spezifischer Paarung der vollständigen Länge der Primersequenz. Alle Sequenzen vom ersten Schritt werden nun exponentiell amplifiziert.

Reaktionsansatz:

PCR-Puffer (ohne MgCl ₂)	1x
dNTP-Mix (2 mM dG,dA,dC,dT)	0,2 mM
Biotin- oder Digoxigenin-dUTP	1mM
6-MW Primer (20 µM)	2 µM
MgCl ₂ (20 mM)	2 mM
<i>Template</i> -DNA	0,1-1 ng/µl
<i>Taq</i> -Polymerase	1,25 U
H ₂ O	ad 50 µl

Programmablauf:

5,0 min	94°C		
1,0 min	94°C	}	5x
1,5 min	30°C		
3,0 min	30-72°C		
3,0 min	72°C		
1,0 min	94°C	}	25-35x
1,0 min	62°C		
3,0 min	72°C		
10 min	72°C		

2.2.10.3. Digoxigenin-Markierung von DNA-Sonden durch Random-Priming

Für die Markierung von DNA mit Digoxigenin nach der Methode von FEINBERG & VOGELSTEIN (1983) wurde der „DIG-High Prime“-Kit von Roche verwendet. Das Reaktionsgemisch enthält hexamere Oligonukleotide, die als Zufallprimer dienen, das Klenow-Enzym (1 U/µl), Digoxigenin-11-dUTP (0,35 mM), dTTP (0,65 mM), dATP (1 mM), dCTP (1 mM) und dGTP (1 mM) in einem optimierten Reaktionspuffer-Konzentrat in 50% Glycerin.

1 µg DNA wurde mit sterilem H₂O auf ein Endvolumen von 16 µl aufgefüllt. Die Denaturierung der DNA erfolgte durch Erhitzen für 10 min in einem Wasserbad (100°C) und schnellem Abkühlen in einem Eis/Ethanol-Bad (-20°C). 4 µl des „DIG-High Prime“-Kit-Reaktionsgemisches wurden in das eiskalte Reaktionsgefäß pipettiert. Dieses wurde kurz gemischt und anzentrifugiert. Um das Reaktionsgemisch nur sehr langsam zu erwärmen, wurde das kalte Reaktionsgefäß im Becherglas mit dem Eis/Ethanol-Bad in ein 37°C warmes Wasserbad gestellt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die markierte DNA mit Ethanol präzipitiert (Kap.2.2.3.1.).

Die Ausbeute an neusynthetisierter markierter DNA konnte durch sehr langsames Erwärmen des Reaktionsgemisches im Wasserbad und durch Steigerung der Inkubationszeit (1-20 h) erhöht werden.

2.2.10.4. Nick-Translation

Für die Nick-Translation werden zwei Enzyme eingesetzt, die DNase I, die Einzelstrangbrüche (*nicks*) in der doppelsträngige DNA erzeugt, und die DNA-Polymerase I aus *E. coli*. Die 5'→3'-Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase I entfernt 5' vom

Einzelstrangbruch gelegene Nukleotide. Die DNA-Polymeraseaktivität katalysiert am 3'-OH-Ende des Einzelstrangbruchs den Einbau neuer dNTPs. In 5'→3'-Richtung entsteht ein neuer DNA-Strang, in den markierte dNTPs eingebaut werden.

Um Sonden nach diesem Verfahren mit Digoxigenin zu markieren, wurde ein „DIG-Nick Translation Mix“ von Roche verwendet. Dieser ist zusammengesetzt aus DNA-Polymerase I, DNase I, dATP (0,25 mM), dCTP (0,25 mM), dGTP (0,25 mM), dTTP (0,17 mM) und Digoxigenin-11-dUTP (0,08 mM) und liegt in einem stabilisiertem Reaktionspuffer in 50% Glycerin vor. 1 µg der zu markierende DNA wurden mit sterilem H₂O auf ein Endvolumen von 16 µl aufgefüllt und 4 µl „DIG-Nick-Translation Mix“ dazugegeben. Nach sorgfältigem Vermischen von DNA und „DIG-Nick-Translation Mix“ folgte eine Inkubation von 1,5 h bei 15°C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0) und Erhitzen auf 65°C für 10 min gestoppt.

Für die Markierung mit Biotin wurde ein „Nick-Translation Mix“ (Roche) verwendet. Die zu markierende DNA (1 µg) wurde mit sterilem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 12 µl aufgefüllt und mit jeweils 4 µl „Nick-Translation Mix“ und 5x Nukleotid-Mix (0,08 mM Biotin-16-dUTP, 0,25 mM dNTP) vermischt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C.

Nach Beendigung der Reaktionen wurde eine Ethanolpräzipitation der markierten DNA durchgeführt (Kap.2.2.3.1.). Das Sediment wurde in 20 µl sterilem H₂O aufgenommen und die Einbaueffizienz der markierten Nukleotide durch Dot-Blot-Hybridisierung getestet.

2.2.10.5. Enzymatische Überprüfung der DNA-Markierung

Um die Inkorporation von Biotin-bzw. Digoxigenin-markierten Nukleotiden in DNA-Fragmenten nachzuweisen, wurden diese zunächst an positiv geladene Membran (Hybond N⁺-Membran, Amersham) gebunden. Dazu wurde die zu testende Probe (0,5-7 µl) aufgetragen, über 5 – 10 min an der Luft getrocknet und 30 sec auf dem Transilluminator mit UV-Licht bestrahlt. Der Nachweis erfolgte durch die Zugabe eines für Biotin-bzw. Digoxigenin-spezifischen Nachweisreagens, an das alkalische Phosphatase gekoppelt ist. Eine Farbreaktion erfolgte durch Umsetzung des Substrates BCIP/NBT zu einem blauen Präzipitat.

Die Membran wurde zunächst unter leichtem Schütteln für 1 min in Puffer I äquilibriert. Unspezifische Antikörperbindungen wurden durch 30-minütige Inkubation in Puffer II reduziert. Nach vorsichtigem Abtropfen der Membran wurde der Antikörper aufgetragen und für 1 h bei 37°C inkubiert. Danach schlossen sich zwei Waschschrte zunächst für 15 min in Puffer I und dann für 2 min in Puffer III an.

Die Detektionslösung wurde auf die Membran gegeben und für 10 min dunkel inkubiert. Die Membran wurde anschließend für 10 min mit H₂O gewaschen und dunkel getrocknet. Bei markierten Proben zeigte sich eine blau/violette Farbreaktion.

Puffer I:

NaCl	0,15 M
Tris-HCl	0,10 M

Der pH-Wert der Lösung wurde mit HCl auf 7,5 eingestellt.

Puffer II:

0,5% Blockingreagenz (Boehringer Mannheim) in Puffer I

Puffer III:

Tris HCl, pH 9,5	0,10 M
NaCl	0,10 M
MgCl ₂	0,05 M

Nachweisreagenzien:

Streptavidin, gekoppelt mit alkalischer Phosphatase, wurde 1 : 1000 in Puffer I verdünnt (Endkonzentration: 0,75 U ml⁻¹).

Anti-Digoxigenin, gekoppelt mit alkalischer Phosphatase, wurde 1 : 5000 in Puffer I verdünnt (Endkonzentration: 0,15 U ml⁻¹).

Detektionslösung:

75 µl BCIP/NBT + 4925 µl Puffer III

2.2.10. Präparation pflanzlicher Chromosomen

Bevor Chromosomen aus Blatt-oder Blütenmaterial präpariert und für die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung eingesetzt werden können, muss eine Aktivierung und Anreicherung der sich teilenden Zellen im Gewebe erfolgen. Nur Präparate mit einer möglichst großen Anzahl von in Teilung befindlichen Zellkernen können für die *in situ*-Hybridisierung eingesetzt werden. Weiterhin ist es unbedingt erforderlich, die zur Präparation verwendeten Objektträger zu reinigen. Bei nicht vorbehandelten Objektträgern besteht die Gefahr, dass präparierte Chromosomen während der Durchführung der *in situ*-Hybridisierung sich ablösen und nicht mehr nachweisbar sind.

2.2.10.1. Synchronisierung und Fixierung des Pflanzenmaterials

Etwa 1,5 cm lange Herzblätter junger Pflanzen wurden zur Anreicherung und Fixierung von Chromosomen in der Metaphase in 2 mM 8-Hydroxychinolin für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert, dann für einige Stunden in Fixierlösung bei RT fixiert und anschließend bei -20°C in frischer Fixierlösung gelagert. Das Material war für mehrere Monate verwendbar.

Für die Präparation aus Wurzelspitzen wurde Saatgut auf feuchtem Filterpapier 1-2 Tage bei 26°C inkubiert. Bei einer Wurzellänge von ca. 0,5 cm wurden die Keimlinge 18 h bei 26°C auf Filterpapier, das in 0,001% Hydroxyharnstoff getränkt war, inkubiert. Nach intensivem

Spülen mit destilliertem Wasser wurde das gekeimte Material weitere 5 h auf feuchtem Filterpapier bei 26°C belassen. Danach wurden die Wurzelspitzen abgenommen und nach einer fünfstündigen Hydroxychinolinbehandlung (8 mM) in Methanol/ Eisessig (3:1) fixiert.

2.2.10.2. Vorbehandlung der Objektträger

Um eine gute Haftung der Chromosomen zu gewährleisten und Verluste von Chromosomen zu vermeiden, ist eine sehr saubere Glasoberfläche der Objektträger notwendig. Sie wurden deshalb für mindestens 2 h mit Chromschwefelsäure vorbehandelt und dann für 15 min unter fließendem Wasser gewaschen. Anschließend wurden sie mehrmals mit destilliertem Wasser gespült und bei 37°C getrocknet. Unmittelbar vor dem Gebrauch wurden die Objektträger mit 100% Ethanol gespült und getrocknet.

Für die Präparation von gestreckter DNA aus BACs wurden polylysinbeschichteten Objektträgers (Sigma P 0425) käuflich erworben.

2.2.10.3. Präparation von Chromosomen

Die Isolierung von Zellkernen und die Herstellung von Chromosomenpräparaten für die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung erfordert zunächst eine enzymatische Vorbehandlung zur Lockerung und Auflösung des festen Zellgefüges (Mazeration). Die Präparation von Chromosomen aus Blattmaterial oder aus Antheren, als auch aus unterschiedlichen Spezies verlangt Enzymmischungen variierender Zusammensetzung.

Die Spreitung und Fixierung der Chromosomen auf dem Objektträger, die nach enzymatischen Verdau des pflanzlichen Gewebes im Reaktionsgefäß durchgeführt wird, kann durch verschiedene Verfahren erfolgen. Bei den Tropfpräparationen wird eine aufgereinigte Kernsuspension auf den Objektträger getropft. Bei der Quetschpräparation wird das mazerierte Pflanzenmaterial auf dem Objektträger zerkleinert und durch Druck auf ein Deckgläschen gespreitet.

2.2.5.3.1. Mazeration des pflanzlichen Gewebes

Es wurden verschiedene Enzymmischungen verwendet, da das Pflanzenmaterial stark variierte. Die optimalen Bedingungen für die Mazeration mussten jeweils empirisch getestet werden. Für die Präparationen von Zellkernen aus Blüten war eine hohe Konzentration Cytohelicase in der Enzymmischung notwendig. Aber auch Pflanzenart, Wuchsbedingungen, Größe oder Alter der Blätter beeinflussten die Mazeration. Daher war es notwendig, verschiedene Enzymmischungen und variierende Inkubationszeiten zu testen.

Die Enzymmischung I nach dem Handbuch des „*Practical course on molecular cytogenetics of higher plant*“ (Wageningen, 1998) wurde für die Mazeration von Blättern eingesetzt. Für 1-3 Blättchen von ca. 2-8 mm wurden 500 µl Enzymlösung in ein Gefäß gefüllt. Die Inkubationszeit war sehr variabel und musste immer individuell überprüft werden. Bei 37°C (Wasserbad!) war eine Zeit von 2-6 h oder eine gestaffelte Inkubation über Nacht notwendig. Bei der Inkubation über Nacht wurde das Material zunächst 1-2 h bei 37°C vorbehandelt, dann 15-18 h bei 4°C und anschließend 1-3 h bei 37°C inkubiert.

10x Enzympuffer:

Natriumzitat	60 mM
Zitronensäure pH 4,5	40 mM
Zum Gebrauch 1 : 10 in H ₂ O verdünnen	

Enzymmischung I:

3,0% Cellulase	(<i>Aspergillus niger</i> 0,45 U mg ⁻¹ ; C-1184)
0,1% Cellulase	(Onozuka, 1,3 U mg ⁻¹ ; 16419)
0,3% Pectolyase	(<i>Aspergillus japonicus</i> , 3,9 U mg ⁻¹ ; 76305)
0,3% Cytohelicase	(<i>Helix pomatia</i> ; C-8274)

in sterilem 10 mM Zitratpuffer (pH 4,5)

Für die Mazeration von Blütenmaterial (Blütenstand ca. 1-1,5 cm Länge) wurden 800-1000 µl der Enzymmischung II verwendet:

Enzymmischung II:

3,0% Cellulase	(<i>A. niger</i> 0,45 U mg ⁻¹ ; C-1184)
0,1% Cellulase	(Onozuka, 1,3 U mg ⁻¹ ; 16419)
0,3% Pectolyase	(<i>A. japonicus</i> , 3,9 U mg ⁻¹ , 76305)
1,0% Cytohelicase	(<i>H. pomatia</i> , C-8274)

in sterilem 10mM Zitratpuffer (pH 4,5)

Eine verbesserte Mazeration von einigen Wildrübenblättchen wurde in Enzymmischung III nach SCHWARZACHER & HESLOP-HARRISON in „*Practical in situ Hybridisation*“ (2000) beobachtet.

Enzymmischung III:

17,8% (80 U ml ⁻¹) Cellulase	(<i>A. niger</i> ; C-1184, Sigma)
0,77% (10 U ml ⁻¹) Cellulase	(Onozuka,; 16419, Serva)
3,0% (13,5 U ml ⁻¹) Pektinase	(445 U ml ⁻¹ , P-0690, Sigma)

in sterilem 10 mM Zitratpuffer (pH 4,8)

Für die Mazeration von Blütenmaterial wurde der Enzymmischung III noch 1% Cytohelicase (*Helix pomatia*, C-8274, Sigma) hinzugefügt.

2.2.5.3.2. Spreitung der Chromosomen

Für die Spreitung der Chromosomen auf dem Objektträger wurden drei verschiedene Verfahren angewendet. Für die Tropfpräparation wird aus dem mazerierten Gewebe eine Zellkernsuspension hergestellt, die dann auf den Objektträger getropft wird. Tropfpräparation A und B unterscheiden sich hinsichtlich der Art des Auftropfens der Zellkernsuspension. Für eine Quetschpräparation wird das mazerierte Material auf dem Objektträger zerkleinert und durch das Auflegen eines Deckgläschens zerdrückt. Dabei werden die Chromosomen gespreitet.

Tropfpräparationen A:

Die Tropfpräparate wurden in einer modifizierten Form nach der Methode von AMBROS *et al.* (1986) hergestellt.

Zwei bis drei etwa 2-8 mm lange, fixierte Herzblätter wurden für 2x 15 min in 1x Enzympuffer auf einem Schüttler gewaschen und in 1 ml Enzymlösung bei 37°C 3-4 h bis zur Mazeration der Zellwand verdaut. Das verbleibende Gewebe wurde mit einer Pinzette

zerstoßen und die Zellsuspension anschließend zentrifugiert. Die Umdrehungszahl und die Zentrifugationsdauer richteten sich hierbei nach der zu bearbeitenden Pflanzenart. Material von *Beta vulgaris* wurde 4 min bei 1000xg zentrifugiert. Bei Wildrübenarten wurde 2-4 min bei 500-700xg zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, das zellkernhaltige Pellet in 1 ml Enzympuffer (6 mM Natriumzitat, 4 mM Zitronensäure, pH 4,5) resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Waschschrift wurde drei bis viermal wiederholt. Nach Abnahme des Überstandes wurde 1 ml Fixierlösung zugegeben und nochmals zentrifugiert. Dieser Fixierungsschritt wurde zwei-bis dreimal wiederholt. Die Zellkerne wurden in 100 µl Fixierlösung resuspendiert. 10-15 µl dieser Suspension wurden aus 50 cm Höhe, mit einer durch ein Stativ befestigten Pipette, auf einen gereinigten Objektträger getropft. Zum weiteren Spreiten der Chromosomen wurde der Objektträger kräftig geschüttelt. Die Trocknung der Präparate erfolgte an der Luft und die Überprüfung ihrer Qualität bei 200-facher Vergrößerung am Phasenkontrastmikroskop. Geeignete Chromosomenpräparate wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4°C trocken gelagert.

Tropfpräparation B:

Das mazerierte Blättchen wurde als Ganzes aus der Enzymlösung entnommen und auf einen Objektträger gelegt. Überflüssige Enzymlösung wurde vorsichtig abgesaugt und durch Enzympuffer (6 mM Natriumzitat, 4 mM Zitronensäure pH 4,5) ersetzt. Überflüssiger Enzympuffer wurde abgesaugt und der Blattgrund des Blattes mit dem Skalpell zerkleinert. Die resultierende Zellsuspension wurde auf mehrere Objektträger verteilt und mit 60%iger Essigsäure vermischt. Die Inkubationszeit in der Essigsäure variierte zwischen 2 und 10 min. Fixierlösung (Methanol/ Eisessig 3:1) wurde kreisförmig um die Suspension pipettiert und ein Tropfen direkt auf die Suspension gegeben. Um nicht festhaftende Zelltrümmer und Zytoplasmareste zu entfernen, wurde das Präparat mit 500 µl Fixierlösung gewaschen und anschließend im Ständer getrocknet.

Für die Präparation von meiotischen Stadien wurde die mazerierte Blüte in eine Petrischale (6 cm) mit 2-3 ml Enzympuffer überführt. Die Antheren wurden vom Blütenstand abgetrennt und auf einen Objektträger übertragen. Nach der Zerkleinerung mit einem Skalpell wurde das Material wie oben beschrieben mit Essigsäure und Fixierlösung behandelt. Die Präparation erfolgte mit Hilfe eines Zeiss Stereomikroskops („Stemi“ 2000C) bei 10facher Vergrößerung. Wenn die Zellkerne von unverdaulichem zytoplasmatischen Material umgeben waren, wurde eine Inkubation mit 60%iger Essigsäure bei 60°C durchgeführt.

Quetschpräparation:

Es wurden Quetschpräparate in einer modifizierten Form nach SCHWARZACHER *et al.* (1980) hergestellt.

Etwa 2-8 mm lange, fixierte Herzblätter wurden in Enzympuffer (6 mM Natriumzitat, 4 mM Zitronensäure pH 4,5) zweimal 15 min auf einem Schüttler gewaschen und dann in 1 ml Enzymlösung (bei 37°C ungefähr 3,5 h bis zur Mazeration der Zellwände inkubiert. Die Enzymlösung wurde abgenommen und die Blättchen wurden vorsichtig in 1 ml Enzympuffer gewaschen. Das mazerierte Blättchen wurde auf einem gereinigten Objektträger in einen Tropfen Essigsäure (45%) überführt. Unter einem Stereomikroskop („Stemi“ 2000C, Zeiss) erfolgte daraufhin das Herauspräparieren und Zerteilen des am Blattgrund befindlichen Meristems. Anschließend wurde ein sauberes Deckglas aufgelegt und darauf mit einer Präpariernadel vorsichtig geklopft, bis das Gewebe zerfallen und gleichmäßig verteilt war. Zuletzt folgte ein starkes Nachquetschen mit dem Daumen. Zum Abfrieren des Deckglases wurden die Objektträger für 10 min auf Trockeneis gelegt oder in flüssigen Stickstoff eingetaucht. Das Entfernen des Deckglases erfolgte mit Hilfe einer Rasierklinge. Die Chromosomenpräparate wurden abschließend an der Luft getrocknet und

ihre Qualität im Phasenkontrastmikroskop bei 200facher Vergrößerung überprüft. Geeignete Präparate wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4°C trocken gelagert.

2.2.10. Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung an mitotischen und meiotischen Chromosomen

Bevor die *in situ*-Hybridisierung einer DNA-Sonde an chromosomale DNA erfolgen kann, ist eine Vorbehandlungen der Präparate erforderlich. Zell- und Zytoplasmareste auf dem Objektträger müssen entfernt werden. Danach werden die Chromosomenpräparate ein weiteres Mal fixiert. Nach der darauffolgenden Denaturierung von DNA-Sonde und Chromosomen erfolgt die Hybridisierung über Nacht. Durch nachfolgende nichtstringente bzw. stringente Waschschrte wird überschüssige bzw. unspezifisch gebundene DNA-Probe entfernt. Die Hapten-gekoppelte DNA-Sonde kann dann durch Fluoreszenz-markierte Antikörper detektiert werden.

Vorbehandlung der Chromosomenpräparate:

Zunächst werden auf den Objektträgern mit den Chromosomenpräparationen die Bereiche, auf dem die fixierten Zellkerne lokalisiert sind, mit einem Diamantstift markiert und die Präparate mit einer durchlaufenden Nummer gekennzeichnet.

Unspezifische Hybridisierung der Sonde soll durch Entfernung von RNA reduziert werden. Eine anschließende kurze Pepsinbehandlung führt zur Beseitigung des Zytoplasmas und zu einer verbesserte Permeabilität des fixierten Materials. Dadurch wird die spezifische Anlagerung der Sonde an der chromosomalen Zielsequenzen erleichtert. Durch Inkubation in Paraformaldehyd werden die Chromosomen stärker an der Glasoberfläche fixiert und ihre Struktur stabilisiert.

1. RNase A-Behandlung:

Die RNase A-Stammlösung (10 mg/ml) wurde 1:100 in 2x SSC verdünnt. 200 µl dieser Lösung wurden auf jeden Objektträger gegeben, mit einem Kunststoffstreifen abgedeckt und 1 h bei 37°C inkubiert. Nach Entfernung der Abdeckung wurden die Objektträger in ein Coplin-Gefäß überführt und 3x 5 min in 2x SSC bei RT auf einem Schüttler gewaschen.

2. Pepsin-Behandlung (Permeabilisierung):

Eine Inkubation mit proteinabbauenden Enzym, wie z.B. Pepsin, macht die Chromosomenpräparate für Sonde und Nachweisreagenzien zugänglicher (Permeabilisierung). Da Pepsin sein Aktivitätsoptimum im sauren Bereich hat, wurden die Präparate für 1 min in 0,01 M HCl äquilibriert. Die Pepsin-Stammlösung (500 µg/ml) wurde 1:50 in 0,01 M HCl verdünnt und 200 µl dieser Lösung auf jedes Chromosomenpräparat pipettiert, mit einem Kunststoffstreifen abgedeckt und für 15 min in einem Thermocycler („*Touch down*“, MWG) bei 37°C inkubiert. Nach Entfernung der Abdeckung wurden die Präparate in ein Coplin-Gefäß überführt und 2x 5 min in 2x SSC bei RT auf einem Schüttler gewaschen.

3. Nachfixierung:

Zur Nachfixierung wurden die Chromosomenpräparate für 10 min in 4% Paraformaldehyd bei RT inkubiert. Darauf folgten drei gründliche Waschschrte über je mindestens 5 min in 2x SSC auf einem Schüttler, um überschüssiges Paraformaldehyd vollständig zu entfernen.

4. Dehydration:

Die Chromosomenpräparate wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Dazu wurden die Objektträger zunächst 3 min in 70% Ethanol; 3 min in 90% Ethanol und dann 3 min in 100% Ethanol inkubiert. Anschließend wurden sie an der Luft getrocknet.

Denaturierung und Hybridisierung:

Die Stringenz, mit der die *in situ*-Hybridisierung durchgeführt wird, bestimmt den Prozentsatz korrekt gepaarter Nukleotide im Doppelstrang aus Sonde und Zielsequenz. Die Stringenz der Hybridisierung wird durch die Formamid- und SSC-Konzentration eingestellt und kann anhand der zwei folgenden Formeln berechnet werden (LEITCH *et al.* 1994):

$$\text{Stringenz (\%)} = 100 - M_f (T_m - t_a)$$

$$T_m = 0,41 (\%GC) + 16,1 \log M - 500/n - 0,61 (\%Formamid) + 81,5$$

M_f : Fehlpaarungsfaktor (1 für Sonden über 150 bp, 5 für Sonden unter 20 bp Länge);
 T_m : errechnete Schmelztemperatur (°C) für DNA-Doppelstränge, die länger als 250 bp sind;
 t_a : Temperatur (°C), bei der die *in situ*-Hybridisierung bzw. die Waschschrte durchgeführt werden;
 (%GC): prozentualer Anteil von Guanin und Cytosin;
 M : Konzentration monovalenter Kationen (Na^+) (mol^{-1});
 n : Sondenlänge in Basenpaaren;
 (%Formamid): Formamidkonzentration in Volumenprozent

Bei den hier verwendeten Sonden erfolgte die *in situ*-Hybridisierung bei einer Stringenz von 76%.

Hybridisierungslösung:

Formamid (Ultra pure)	50%
Dextransulfat	20%
SSC	2x
SDS	0,15%
Salmon-sperm-DNA	250 ng / μl
DNA-Sonde	1 ng / μl
H ₂ O	ad 30 μl

Die fertige Hybridisierungslösung wurde kurz anzentrifugiert und für 10 min bei 70°C in einem Wasserbad denaturiert und anschließend 5 min auf Eis inkubiert. Die Hybridisierungslösung wurde vollständig auf die Chromosomenpräparate aufgetragen. Mit einem Kunststoffstreifen wurden die Präparate blasenfrei abgedeckt. Die Denaturierung der Chromosomen, sowie die Reassoziaton der DNA erfolgte durch schrittweise Abkühlung der Chromosomenpräparate im Thermocycler.

Für *Beta*-Arten wurde folgendes Programm verwendet:

8 min	70°C
5 min	55°C
2 min	50°C
3 min	45°C
10 min	37°C

Danach erfolgte der Transfer der Chromosomenpräparate in eine vorgewärmte Feuchtekammer und die Inkubation bei 37°C über Nacht.

Stringente Waschschrte nach der Hybridisierung:

Um unspezifisch gebundene Sonden zu entfernen, erfolgten die Waschschrte nach der Hybridisierung unter stringenteren Bedingungen als die Hybridisierungsreaktion. Die Stringenz der Waschlösung ist von der Formamid- und Salzkonzentration sowie von der Temperatur abhängig. In den meisten Fällen wurde mit einer Stringenz von 79% gearbeitet. Für den Nachweis von LINEs, die sehr heterogen, mit hoher Sequenzdivergenzen im Genom vorhandenen sind, wurde die Stringenz auf 72% reduziert.

Nach der Hybridisierung wurden die Chromosomenpräparate zunächst zur leichteren Entfernung des Kunststoffstreifens in 2x SSC bei 42°C getaucht und daraufhin in einem Coplin-Gefäß 2x 5 min bei 42°C in Waschlösung (20% Formamid in 0,1x SSC) inkubiert. Im Anschluß daran wurde 2x 5 min bei 42°C und 1x 5 min bei RT in 2x SSC gewaschen.

Antikörperreaktion und Signaldetektion:

Nach der Hybridisierung der Sonde und den stringenten Waschschrten wurden die Sonden detektiert. Das Nachweisverfahren richtete sich dabei nach der Art der Sondenmarkierung.

Eine mit Digoxigenin-11-dUTP markierte Sonde wurde immunologisch über ein F_{ab}-Fragment nachgewiesen, das mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt war. Es handelte sich in diesem Fall um das Konjugat Anti-Digoxigenin-Fluoresceinisothiocyanat (Anti-Digoxigenin-FITC). Eine mit Biotin-16-dUTP markierte Sonde wurde durch Indocarbocyanin-gekoppeltes Streptavidin (Cy3-Streptavidin) nachgewiesen.

Um die Objektträger zu äquilibrieren, wurden sie zunächst 5 min in 4x SSC/Tween 20 inkubiert. Anschließend wurden 200 µl 5% BSA in 4x SSC/Tween 20 auf jeden Objektträger gegeben, dieser mit Kunststoffstreifen abgedeckt und 10 min inkubiert. Dann wurde die Abdeckung entfernt, überschüssige Flüssigkeit abgetropft und 30 µl der Detektionslösung auf den Objektträger gegeben.

Detektionslösung:

Anti-Digoxigenin-FITC	1 : 100 in 3% BSA in 4x SSC/Tween 20
Streptavidin-Cy3	1 : 150 in 3% BSA in 4x SSC/Tween 20

Die abgedeckten Objektträger wurden 1 h bei 37°C in einer Feuchtekammer inkubiert. Danach wurden sie in ein Coplin-Gefäß überführt und ohne Abdeckung 3x 5 min bei 42°C in 4x SSC/Tween gewaschen.

Bei einem direkten Nachweis, bei dem DNA-Sonden eingesetzt wurden, die Fluorochromgekoppelte Nukleotide (z.B. dNTPs gekoppelt mit FITC oder Cy3) enthalten, war eine Detektion mit Antikörpern nicht notwendig, da die DNA-Sonden nach der Hybridisierung direkt im Fluoreszenzmikroskop lokalisiert werden können.

Zur Gegenfärbung des Chromatins wurde 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) verwendet, da die Anregungs- und Emissionswellenlängen dieses Farbstoffes nicht mit denen der eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe FITC bzw. Cy3 überlappen. Es wurde hierzu 100 µl DAPI-Lösung (2-4 µg/ml) auf den Objektträger gegeben, dieser mit einem Kunststoffstreifen abgedeckt und 10 min bei RT inkubiert. Das Ablösen der Abdeckung wurde durch kurzes Eintauchen der Objektträger in 4x SSC/Tween 20 erleichtert.

Die fluoreszierenden Signale bleichen unter UV-Licht aus, was als *fading* bezeichnet wird. Zur Stabilisierung der Signale wurden die Präparate daher in einem Tropfen *Antifade*-Lösung (Citifluor AF1 oder Vectashield H-1000) eingebettet. Der Objektträger wurde mit einem Deckgläschen (24x 32 mm) abgedeckt. Durch vorsichtiges Andrücken des

Deckgläschens wurde überschüssige *Antifade*-Lösung mit einem Filterpapier abgesaugt und die Unterseite des Objektträgers mit H₂O gereinigt. Die Präparate waren bei 4°C mehrere Monate auswertbar.

2.2.10. Rehybridisierung der Chromosomenpräparaten

Um ein Chromosomenpräparat mehrfach für eine FISH einsetzen zu können, wurde eine Methode zur Rehybridisierung nach HESLOP-HARRISON *et al.* (1992) verwendet. Nach einer *in situ*-Hybridisierung wurde der Objektträger zur Verflüssigung des Citifluor AF1 auf 50°C erwärmt. Das Deckglas konnte dann vorsichtig mit einer Rasierklinge abgehoben werden. Um die Signale zu entfernen, wurde das Präparat in einem Coplin-Gefäß bei 42°C im Wasserbad 2x 5 min in 2x SSC, dann 1x 30 min in 4x SSC/Tween 20 und anschließend 3x 10 min in 2x SSC gewaschen. Danach wurde 10 min in 4% Paraformaldehyd bei RT nachfixiert und 3x 10 min in 2x SSC auf einem Schüttler gewaschen. Die Dehydratation der Chromosomenpräparate erfolgte durch eine aufsteigende Ethanolreihe (70%, 90%, 100%) und nachfolgender Trocknung an der Luft. Nach dieser Behandlung konnte das Präparat ein weiteres Mal denaturiert und hybridisiert werden. Eine Vorbehandlung der Präparate mit RNase und Pepsin war nicht notwendig.

2.2.10. Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung an gestreckten Chromatinfasern

Durch *in situ*-Hybridisierung an gestreckten Chromatinfasern ist es möglich, die Anordnung chromosomal eng benachbarte DNA-Sequenzen aufzuzeigen und dadurch eine physikalische Feinkartierung von Chromosomenabschnitten durchzuführen. Die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung an Chromatinfasern gehört zu den hochauflösenden Verfahren der *in situ*-Techniken. Zur Herstellung der Chromatinfasern wird zunächst eine Zellkernsuspension aus Blattgewebe isoliert und auf Objektträger gebracht. Nach Fixierung ist es möglich, eine *multi-colour* Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung an diesen gestreckten Chromatinfasern durchzuführen (FRANSZ *et al.*, 1996).

2.2.10.1. Präparation einer Zellkernsuspension

Etwa 2 g frisches Blattmaterial wurden mit destilliertem Wasser abgespült, vorsichtig trocken getupft und in flüssigem Stickstoff gemörsert. Das fein zerstoßene Gewebe wurde in 20 ml eiskaltem NIB (*Nuclei Isolation Buffer*) überführt und 5 min vorsichtig vermischt. Große Partikel wurden durch mehrere Filtrationsschritte durch Nylongewebe (MONYL, HydroBios) mit immer kleiner werdenden Porengrößen (170, 50 und 20 µm) abgetrennt. Zum Filtrat wurde 1 ml eiskaltes NIB mit 10% (v/v) Triton X-100 zugegeben und die Zellkernsuspension anschließend zentrifugiert (Ausschwingrotor Megafuge 1.0 R; 2000 rpm, 10 min, 4°C). Das Pellet wurde in 200 µl NIB resuspendiert. Die Anzahl, Qualität und Morphologie der Zellkerne wurde nach Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI im Fluoreszenzmikroskop kontrolliert. Die Zellkerndichte in der Kernsuspension sollte etwa 5x 10⁶ Kerne pro Milliliter betragen.

Die Kernsuspension war nach Zusatz von sterilem Glycerin (Endkonzentration 50%) bei -20°C einige Monate haltbar.

NIB (*Nuclei Isolation Buffer*):

Tris HCl, pH 9.5	10 mM
EDTA	10 mM
KCl	100 mM

Saccharose	500 mM
Spermidine	4 mM
Spermin	1 mM
2-Mercaptoethanol	0,1% (v/v)

2.2.10.2. Präparation von gestreckten Chromatinfasern

20-50 µl Kernsuspension wurden bei 750xg über 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 50 µl PBS resuspendiert. Zwei Tropfen von je 1 µl der Suspension wurden auf einen ethanolgereinigten Objektträger aufgetragen. Nach dem Antrocknen wurden 20 µl frischer STE-*Lysis*-Puffer zugefügt und 6 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Lyse der Kerne wurde das Chromatin freigesetzt. Durch Kippen des Objektträgers in einem Winkel von 30°-45° floss der Tropfen langsam über die Glasoberfläche ab. Das Chromatin aus den lysierten Kernen wurde entlang des Objektträgers gestreckt. Nach dem Antrocknen wurden die Präparate 3 min in 96% Ethanol inkubiert und 3 h bei 60°C fixiert. Die Qualität der gestreckten Chromatinfasern wurde durch Anfärben mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI im Fluoreszenzmikroskop stichprobenartig überprüft. Präparate, die angefärbt und unter Fluoreszenz betrachtet wurden, wurden nach Möglichkeit nicht für eine FISH weiter verwendet, da die UV-Strahlung die Chromatinfasern zerstörte. Die Präparate wurden bei Raumtemperatur gelagert und innerhalb einer Woche für die FISH eingesetzt. Präparate konnten aber auch in trockenen Gefäßen bei 4°C über einen längeren Zeitraum gelagert werden.

STE-*Lysis*-Puffer:

Natriumdodecylsulfat (SDS)	0,5% (w/v)
Tris HCl, pH 7	100 mM
EDTA	5 mM

PBS: phosphatgepufferte Salzlösung, pH = 7,4

NaCl	130mM
Na ₂ HPO ₄	7mM
NaH ₂ PO ₄	3mM

2.2.10.3. *fib*-FISH

1. RNase A-Behandlung:

Die RNase A-Stammlösung (10 mg/ml) wurde 1:100 in 2x SSC verdünnt. 200 µl dieser Lösung wurden auf jeden Objektträger gegeben, mit einem Kunststoffstreifen abgedeckt und 1 h bei 37°C inkubiert. Nach Entfernung der Abdeckung wurden die Objektträger in ein Choplin-Gefäß überführt und 2x 5 min in 2x SSC bei RT auf einem Schüttler gewaschen.

2. Paraformaldehydfixierung:

Zur Nachfixierung wurden die Objektträger für 10 min in 4% Paraformaldehyd bei RT inkubiert und anschließend 3x 5 min in 2x SSC auf einem Schüttler gewaschen.

3. Dehydration:

Die Objektträger wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Dazu wurden die Objektträger je 3 min in 70% , 90% und 98% Ethanol inkubiert. Anschließend wurden sie an der Luft getrocknet.

4. Denaturierung und Hybridisierung:

Die Präparate wurden genau 2 min in 70% Formamid 2x SSC bei 70°C inkubiert und anschließend direkt in einer eiskalten aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert. Nach je 3 min in 70%, 90% und 98% Ethanol wurden die Präparate luftgetrocknet. Die Hybridisierungslösung (30 µl-Ansatz, Kap.2.2.6.) wurde 10 min bei 70°C inkubiert und 5 min auf Eis gehalten. Nach vollständigem Auftragen der Hybridisierungslösung wurde die Flüssigkeit mit einem Kunststoffstreifen abgedeckt und die Präparate in eine vorgewärmte Feuchtekammer transferiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

Die stringenten Waschschrte nach der Hybridisierung, Antikörperreaktion und Signaldetektion erfolgten analog Kap.2.2.6. Nach der Färbung der Chromosomen mit DAPI wurden zur Stabilisierung der Signale die Präparate in Vectashield H-1000 eingebettet.

2.2.10. Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung an *bacterial artificial chromosomes* (BACs)

Auf Objektträgern fixierte BAC-Moleküle (proteinfreie Plasmid-DNA) können als Hybridisierungstarget der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung eingesetzt werden. Durch den direkten optischen Nachweis von ausgewählten Sequenzen in der genomischen Insertion mittels FISH ist eine optische Kartierung großer Sequenzabschnitte von BAC-Klonen möglich.

2.2.10.1. Herstellung der Präparate

40-60 ng BAC-DNA (*Qiagen-Midi-Präparation*: 100 ng/µl) wurden in 10 µl AF-Lösung (Chem. Lab. Canterbury) auf ein Ende eines poly-Lysin-beschichteten Objektträgers (Sigma P 0425) aufgetragen. Der Tropfen wurde mit einem Deckglas (20x 20 mm) abgedeckt. Das Deckglas wurde langsam zum gegenüberliegenden Ende des Objektträgers gezogen und die Flüssigkeit über das Glas verteilt. Die Präparate wurden 10 min bei Raumtemperatur getrocknet und 2 min in frischem Methanol/Essigsäure-Gemisch (3:1, 4°C) fixiert. Die trockenen Präparate wurden 30 min bei 60°C hitzefixiert und am folgenden Tag für die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung eingesetzt (JACKSON *et al.*, 1999).

2.2.10.2. Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung an BAC-Molekülen

Die Präparate wurden mit 70% Formamid in 2x SSC Lösung über 90 sec bei 70°C denaturiert und sofort durch eine aufsteigende Ethanolreihe (70%, 90% und 98%) bei -20°C dehydriert und luftgetrocknet.

Das Hybridisierungsgemisch mit 50% Formamid, 10% Dextransulfat, 2x SSC, 250 ng/µl Heringssperma-DNA und 1 ng/µl DNA-Sonde wurde 10 min bei 70°C denaturiert und 5 min bei 4°C inkubiert. 30 µl des Hybridisierungsmixes wurden auf die Präparate aufgetragen und mit einem Kunststoffstreifen abgedeckt. Nach einer Inkubation bei 37°C über Nacht (18 h) wurden die Präparate 5 min bei Raumtemperatur in 2x SSC gewaschen. Darauf folgte je ein Waschschrte bei 45°C in 2x SSC für 10 min sowie bei Raumtemperatur in 2x SSC für 5 min. Die Präparate wurden mit 4x SSC/Tween 20 äquilibriert. Die Antikörper- und Signaldetektion erfolgte nach Kapitel 2.2.6.

2.2.10. Fluoreszenzmikroskopie und digitale Bildbearbeitung

Grundlage für die bildliche Darstellung der *in situ*-Hybridisierungssignale ist die Mikroskopie, die größtmögliche Sensitivität und Auflösung gewährleisten muss. Die technischen Möglichkeiten zur photographischen Aufnahme sowie Digitalisierung und Reproduktion der Daten müssen darauf abgestimmt sein. Alle im Mikroskop detektierten Strukturen und Signale sollten bildlich in hoher Qualität darstellbar sein.

2.2.10.1. Auflicht-Fluoreszenzmikroskopie

Fluoreszenzfarbstoffe lassen sich mikroskopisch sichtbar machen, indem man sie mit Licht einer bestimmten Wellenlänge anregt (Anregungslicht) und die ausgestrahlte Fluoreszenz (Emission) mit geeigneten optischen Filtern sichtbar macht. Je nach verwendetem Fluorochrom sind andere Filtersätze notwendig (Tab. 5.1).

Tab. 5.1: Fluoreszenzeigenschaften von FITC, Cy3 und DAPI

Fluoreszenzfarbstoff	Anregungsmaximum (nm)	Emissionsmaximum (nm)	Farbe der Fluoreszenz	Filternummer (Zeiss)
FITC	495	523	grün	09
Cy3	550	570	rot	15
DAPI	358	461	blau	01

Die Auswertung der Signale der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung erfolgte mit dem Auflicht-Fluoreszenzmikroskop „Axioplan2“ der Firma Zeiss. Ultraviolettes, sichtbares und infrarotes Licht wird von einer Quecksilberdampfampe HBO 100 (100 W) ausgesendet. Dieses Fluoreszenzmikroskop ist ausgestattet mit folgenden Filtersätzen: Filter 01 (DAPI), Filter 09 (FITC), Filter 15 (Cy3) und Filter 25 (Dreifachfilterblock für DAPI, FITC und Cy3). Weiterhin stand eine Filmkamera von Zeiss (MC 80) zur Aufnahme von Farbnegativen zur Verfügung.

Im Verlauf der Arbeiten wurde ein weiteres leistungsstärkeres Auflicht-Fluoreszenzmikroskop (Axioplan2 *imaging*) genutzt, das für die Detektion der unikalenen Sonden und der Analyse der Fiber-FISH eingesetzt wurde. „Axioplan2 *imaging*“ besitzt eine verbesserte Optik. Durch eine sogenannte Lichtfalle wird störendes Streulicht minimiert und dadurch der Kontrast erhöht. Die im „Axioplan 2 *imaging*“ verwendeten Objektive (Plan-Neofluar 16x/0,50_{IMM}, Plan-Apochromat 100x/1,4_{OIL}) besitzen eine sehr geringe Eigenfluoreszenz, hohe Lichtstärke und eine hohe numerische Apertur. Durch Verwendung des speziell für diese Objektive entwickelten Immersionsöls „Immersol“ (Zeiss) mit extrem geringer Eigenfluoreszenz ist es möglich, mit einer hohen Auflösung auch schwache Fluoreszenzsignale zu detektieren. Die in Tabelle 5.2 aufgeführten Filtersätze wurden verwendet.

Zur Anregung wurden Schmalbandfilter (BP) verwendet, die Licht innerhalb eines schmalen, definierten Ausschnittes des Spektrums durchlassen. Das emittierte Licht fällt durch einen Langwellensperrfilter (LP), der nur für Licht oberhalb einer bestimmten Wellenlänge durchlässig ist. Zwischen beiden Filtern ist in einem Winkel von 45° zwischen Anregungsfilter und Objekt ein sogenannter dichromatischer Teilerspiegel

(Strahlenteiler: *dichroic beam splitter*: FT) angebracht, der kurzwelliges Licht auf das Präparat reflektiert und das emittierte längerwellige Fluoreszenzlicht passieren läßt.

Tab. 5.2: Verwendete Filtersätze und ihre Eigenschaften

Filtersatz	Anregungs- filter	Emissions- filter	Strahlenteiler	Geeignete Fluorochrome
01	BP 365/12	LP 397	FT 395	DAPI
09	BP 450-490	LP 515	FT 510	FITC, Fluorescein
15	BP 546/12	LP 590	580	Cy3
25 Dreifachfilter- block	TBP 400+495+570	TBP 460+530+610	TFT 410+505+585	DAPI/FITC/Cy3

2.2.10.2. Mikrophotographie und Digitalisierung

Nach Anregung durch die kurzwellige, energiereiche UV-Strahlung verblassen Fluoreszenzfarbstoffe im Fluoreszenzmikroskop trotz der Anwendung von Antibleichmitteln sehr schnell (*fading*). Wenn mehrere Fluorochrome nachgewiesen werden sollen, muss daher zuerst der Farbstoff sichtbar gemacht und photographiert werden, der mit längerwelligem, energieärmerem Licht angeregt wird. Dadurch werden die Fluoreszenzsignale möglichst lang erhalten und die Dokumentation aller Signalfarben ermöglicht.

Die mikroskopischen Bilder wurde bei einer 1600-fachen Vergrößerung mit einer Filmkamera von Zeiss (MC 80 DX) und Verwendung des Farbnegativfilms „Fujicolor Superia 400“ dokumentiert. Die Belichtungszeiten sind abhängig von der Signalstärke und des zur Detektion verwendeten Filtersatzes. Die Zeiten wurden empirisch ermittelt (Tab. 5.3).

Tab. 5.3: Ermittelte Belichtungszeiten (sec)

Signalstärke	Proben	Belichtungszeiten (sec)			
		FITC (Filter 09)	Cy3 (Filter 05)	DAPI (Filter 01)	Dreifachfilterblock (Filter 25)
Stark	Satelliten-DNA	2-4	0,5-3	0,2-1	3-9
Mittel	rRNA-Gene	4-8	3-6	0,2-1	4-10
Schwach	unikale Sequenz	8-13	3-8	0,2-1	8-20

Alternativ wurden digitale Aufnahmen mit einem luftgekühlten CCD-Kamera-System (*charge-coupled device*: Kamera mit gekühltem ladungsgekoppeltem Bildsensor; Quantix/Photometrix) produziert. Die elektronisch gespeicherten Aufnahmen haben im Vergleich zu Photographien eine geringere Auflösung, so dass zur Dokumentation der Ergebnisse bevorzugt Farbfilmabzüge produziert wurden. Vorteilhaft ist eine CCD-Kamera bei der Aufnahme von Fluorochromen, die nicht im sichtbaren Wellenlängenbereich emittieren, da die Kamera mit hoher Effizienz emittierte Photonen über einen weiten Bereich des Spektrums registriert.

2.2.10.3. Bildbearbeitung

Zur genauen Auswertung, optimalen Darstellung und Präsentation der Ergebnisse wurden die Bilder digitalisiert und mit Bildbearbeitungsprogrammen überarbeitet.

Farbnegative wurden mit einem Film-Negativ-Scanner (Nikon LS-1000; 35 mm) bei einer Auflösung von 300 dpi (*dots per inch*) digitalisiert. Die Skalierung wurde so eingestellt, dass eine Dateigröße von 1-2 MB erhalten wurde. Farbabzüge wurden mit einem Flachbettscanner (Epson Twain 5) ebenfalls bei einer Auflösung von 300 dpi eingelesen. Anschließend wurden die Bilder mit dem Software-Programm „Adobe Photoshop 3.0“ oder „Adobe Photoshop 5“ überarbeitet. Der Farbkontrast zwischen Hybridisierungssignal und Bildhintergrund wurde optimiert. Aufnahmen des gleichen Bildausschnitts, die durch unterschiedliche Farbfilter photographiert wurden, konnten überlagert werden. Eine exakte Positionierung eng benachbarter Signale war nur durch digitale Überlagerung der Hybridisierungsmuster möglich. Um Besonderheiten im Bild zu verdeutlichen, wurden Textzeichen und Pfeile in die Darstellung eingefügt. Für eine qualitativ gute Reproduktion durch einen Digitalfarbdrucker war es notwendig die Bildhelligkeit heraufzusetzen und Bildgrößen zu optimieren. Die Bilder wurden als Datei im Format JPG unter dem Modus „*Image Quality: Maximum*“ gespeichert.

Bilddaten, die durch das CCD-Kamera-System (Kap.2.2.10.2) gewonnen wurden, konnten mit dem Bildbearbeitungsprogramm „IPLab“ (Version 2.4) analysiert werden. Durch Umwandlung der Dateiformate von IPL in TIFF, war es möglich die Daten in „Adobe Photoshop 3.0“ zu überarbeiten.

Längenbestimmungen von Chromosomen in den Aufnahmen wurden durch ein spezielles Messprogramm „MicroMeasure Version 3.3“ durchgeführt (REEVES, 2001). Reproduziert wurden die Computerbilder auf dem Digitalfarbdrucker UP-D8800 (Sony) bei einer Auflösung von 300 dpi.

3. Ergebnisse

3.1. Entwicklung hochauflösender Verfahren der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung für die Genomanalyse der Gattung *Beta*

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten hochauflösende Verfahren der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) für die Genomanalyse der Gattung *Beta* erarbeitet, etabliert und angewendet werden. Hochauflösende Verfahren der FISH ermöglichen die Analyse der Feinstruktur von Chromosomen. Eine chromosomale Lokalisierung von DNA-Sequenzen mit hoher Sensitivität und Auflösung ist durch eine effiziente Hybridisierung der DNA-Sonden an langgestreckte chromosomale Zielsequenzen möglich. Eine Vergrößerung des Zielortes der Hybridisierung wird durch eine Verringerung des Kondensationsgrades des Chromatins bewirkt. Der Grad der DNA-Kondensation von Chromosomen ist maximal in der Metaphase. Geringer kondensiert ist die DNA der Chromosomen der mitotischen Prometaphase, des meiotischen Pachytänstadiums und während der Interphase. Durch Einsatz unterschiedlicher Chromosomenpräparate kann daher eine physikalische Kartierung der Chromosomen mit zunehmender Auflösung durchgeführt werden. Eine physikalische Feinkartierung von sehr eng gekoppelten Sequenzen ist durch Hybridisierung an gestreckten Chromatinfasern, die nach Auflösung der Kernmembran präpariert werden können, möglich.

Um die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung zur physikalischen Kartierung der Chromosomen der Gattung *Beta* einsetzen zu können, mußte das Verfahren der *in situ*-Hybridisierung zunächst optimiert werden.

In den folgenden Kapiteln werden die erarbeiteten Grundlagen für hochauflösende Verfahren der *in situ*-Hybridisierung dargestellt. Die Anwendungen der ausgearbeiteten und optimierten Verfahren in der Genomanalyse der Zuckerrübe *B. vulgaris*, der Wildrübenarten der Sektion *Procumbentes* und verschiedener Zuckerrübenhybriden werden in den anschließenden Kapiteln 3.2.-3.5. beschrieben.

3.1.1. Optimierung der Präparation mitotischer Chromosomen

Grundlagen für die Präparation von qualitativ hochwertigen Chromosomen, an denen eine Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung möglich ist, sind:

1. die Verwendung von teilungsaktivem Pflanzengewebe mit einem hohen Anteil von Metaphasezellen (hoher Metaphaseindex),
2. eine vollständigen Trennung der Zellen aus dem Gewebeverband durch enzymatischen Abbau von Zellwand und intrazellulären Matrixstrukturen (Mazeration),
3. eine optimale Spreitung und Fixierung der Chromosomen auf dem Objektträger.

Die Optimierung des Präparationsverfahrens hinsichtlich der drei aufgeführten Kriterien wird im folgenden beschrieben.

- Erhöhung des Metaphaseindex:

Um Saatgutressourcen der Wildrüben effizient auszunutzen, wurden Chromosomenpräparate aus Blattmaterial hergestellt. Da der Anteil meristematischer Zellen im gesamten Blatt gering ist, mußte zunächst der Bereich des Blattes ermittelt werden, in dem sich vermehrt teilungsaktive Zellen befinden.

Ein erhöhter Anteil von teilungsaktiven Zellen wurde in Chromosomenpräparaten aus dem Blattgrund bzw. aus dem unteren Bereich der Blattspreite, die an den Blattgrund anschließt, beobachtet. Bei längeren und älteren Blättern (länger als 8 mm) konnten auch in Randbereichen der Blattspreite vermehrt Metaphasezellen nachgewiesen werden. Dies entspricht den Erwartungen, da im Blattgewebe von Dikotyledonen mehrere interkalare Meristemzonen (basiplastes Wachstum) für das Breitenwachstum der Blattes verantwortlich sind. Diese treten im Blattgrund häufiger auf. Am Breitenwachstum des Blattes sind weiterhin Randmeristeme beteiligt (STRABBURGER, 1983), durch die der erhöhte Anteil der Metaphasen in Präparaten aus Blatträndern erklärt werden kann.

Bei Monokotyledonen fördern basale Meristeme in den Nodien das Längenwachstum der Blätter. Dies wurde durch Chromosomenpräparationen aus den Blattknoten von Mais- und Reispflanzen bestätigt. In Präparaten aus den Blattspreiten von Mais und Reis konnten keine oder nur selten Metaphasen gefunden werden, während nach Präparation der Nodiregionen ein erhöhter Anteil an mitotisch aktiven Kernen nachgewiesen wurden.

Eine Aktivierung der teilungsfähigen Zellen wurde in der Gattung *Beta*, insbesondere bei *B. vulgaris*, durch eine Lichtinduktion der Pflanzen erreicht. Werden die Rübenpflanzen über einen Zeitraum von 9 h dunkel gestellt und darauffolgend am frühen Morgen für 4-5 h belichtet, so wurde eine deutliche Zunahme der Metaphasechromosomen in den Präparaten beobachtet. Zur Belichtung wurde die Lichtquelle (SON-T 400, Philips) in einem Abstand von ca. 80 cm über der Pflanze angebracht. Ein Metaphaseindex bis zu 3,5% wurde durch einen derartigen Dunkel-Lichtwechsel in Chromosomenpräparaten aus jungen Pflanzen beobachtet (Abb. 1A). Durch die oben beschriebene Vorbehandlungen konnte regelmäßig ein Metaphaseindex von 1-2% erreicht werden.

- Enzymatischer Abbau von Zellwand und intrazelluläre Matrix:

Enthält das Pflanzenmaterial ausreichend teilungsaktive Zellen, so ist der enzymatische Verdau des Gewebes für die Qualität der Chromosomenpräparate maßgeblich. Zellwand- und Cytoplasmareste um Interphasekerne und Metaphasechromosomen führen zu einer

mangelnden Permeabilität des Präparates und verhindern den Zugang der DNA-Sonde zur Zielsequenz. An nicht ausreichend mazerierten Chromosomen treten gehäuft unspezifische Bindungen der DNA-Sonde und des zur Sondendetektion eingesetzten Antikörpers auf und verursachen unspezifische Hintergrundsignale. Gleichfalls ungeeignet sind Chromosomen, deren strukturelle Integrität durch die Präparation verletzt wurde. Sie werden während der Denaturierung oft partiell oder vollständig zerstört. Eine chromosomale Lokalisierung der Hybridisierungssignale ist nicht mehr möglich.

Eine Optimierung des enzymatischen Verdaus der Zellgewebe war für die Untersuchungen der Chromosomen der Gattung *Beta* erforderlich. Unterschiedliche Enzymlösungen und Inkubationszeiten wurden getestet. Ein Enzymgemisch aus 3% Cellulase (*Aspergillus niger*), 0,1% Cellulase (Onozuka), 0,3% Pectolyase und 0,3% Cytohellicase führte bei einer Inkubationszeit von 3,5 - 5 h zu einem ausreichenden Abbau von Zellwand und Cytoplasma in den Blättchen von *B. vulgaris*. Durch Unterschiede im Alter der Pflanzen und variierende Wachstumsbedingungen (z.B. Haltung im Gewächshaus oder unter Freilandbedingungen) war das zu untersuchende Blattmaterial oft nicht homogen. Eine individuelle Kontrolle jeder einzelnen Präparation war trotz der gefundenen Richtwerte für die Inkubationszeit daher immer erforderlich. Für die Mazeration von Wildrübenblättern erwies sich ein Enzymgemisch aus 17,8% Cellulase (*A. niger*), 0,77% Cellulase (Onozuka) und 3% Pektinase über 3 - 4 h als geeignet. Die hierbei benötigten hohen Enzymkonzentrationen könnten auf einen im Vergleich zur Zuckerrübe höheren Vernetzungsgrad der Polysaccharide in der Wildrübenzellwand und der Interzellulärsubstanz hinweisen. Wahrscheinlicher ist, daß die festere Epidermisstruktur der Wildrüben, die eine Anpassung an trockene Lebensräume darstellt, eine höhere Enzymkonzentration erforderlich macht. Dies zeigte, dass der enzymatische Verdau des Zellgewebes für jede Pflanzenart individuell optimiert werden muss.

- Spreitung und Fixierung der Chromosomen auf dem Objektträger:

Nach Herauslösung der Zellen aus dem Gewebeverband, Zersetzung von Zellwand und intrazellulären Matrixstrukturen wurden die Chromosomen auf dem Objektträger gestreckt und fixiert. Eine Zellspreitung durch Auftropfen einer Kernsuspension auf einen vorbehandelten Objektträger ermöglichte die Anfertigung von Präparaten mit gleichmäßig hoher Qualität (Tropftechnik). Weiterhin wird ein Verlust einzelner Chromosomen aus vollständigen Metaphasen vermieden. Bei der Quetschpräparation, die üblicherweise für Blattmaterial eingesetzt wird, werden Chromosomen bei der Entfernung des zum Auseinanderpressen des Gewebematerials verwendeten Deckgläschen häufig beschädigt.

Allerdings wurde die Tropftechnik bisher ausschließlich für die Herstellung von Kernpräparaten aus Wurzelspitzen verwendet. Um die Vorteile einer Spreitung der Kerne durch Auftropfen auszunutzen, wurde das Verfahren für Blattgewebe optimiert.

Für die Präparation der Kernsuspension musste das enzymatisch zersetzte Gewebe mehrfach sedimentiert werden. Die Sedimentation der Kernsuspension erwies sich als kritisch, da bei hohen Umdrehungszahlen die Kernmembranen zerstört wurden. Das mazerierte Gewebe aus *B. vulgaris* wurde bei 1000xg sedimentiert, während Wildrübenkerne nur bei 500xg bis maximal 700xg zentrifugiert werden konnten. Um eine saubere Präparation zu erhalten, mussten die Waschschrte mit Enzympuffer drei- bis viermal wiederholt werden. Nach der Auswaschung von Enzymresten wurde das Material fixiert. Um Pufferreste zu entfernen, war es notwendig, die Kernsuspension zwei- bis dreimal mit Fixierlösung zu waschen. Die Anzahl der Waschschrte war abhängig von der Festigkeit des Kernpellets sowie der potentiellen Gefahr, nicht vollständig sedimentierte, cytoplasmafreie Kerne oberhalb des Pellets zu verwerfen. Eine gute Spreitung der Chromosomen wurde durch Auftropfen einer ausreichenden Menge (10-15 μ l) der Suspension auf den Objektträger aus 50 cm Höhe erreicht.

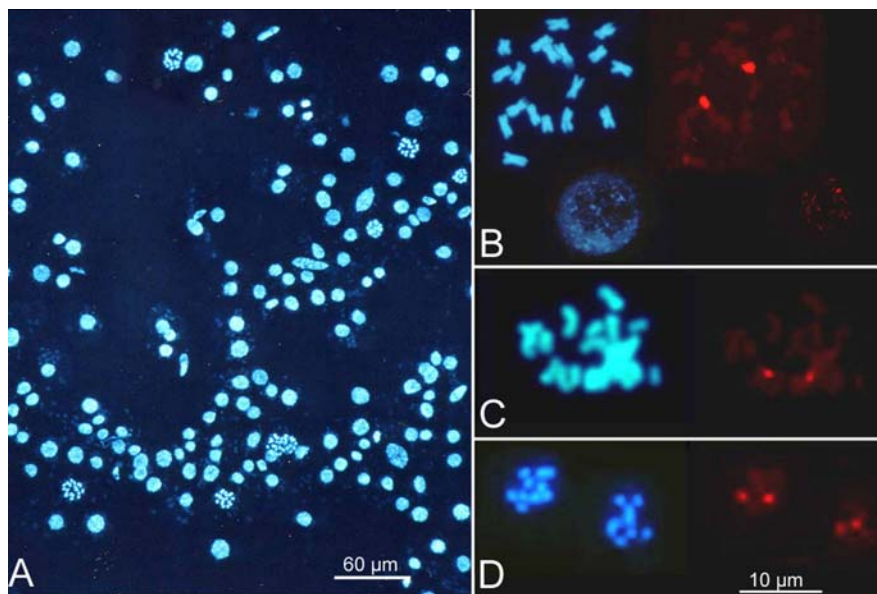


Abb. 2: (A) Chromosomenpräparation aus Blattmaterial von *B. vulgaris* (160x). (B-D) FISH an Chromosomen von *B. vulgaris* ($2n=18$) (B), *Zea mays* ($2n=20$) (C) und *Arabidopsis thaliana* ($2n=10$) (D). Durch die biotinmarkierte DNA-Sonde pTA71 wurde die 18S-5,8S-25S rDNA durch rote Fluoreszenzsignale nachgewiesen. Die Chromosomen wurden mit DAPI angefärbt.

Das Präparationsverfahren wurde sowohl für Blattmaterial der Zuckerrübe *B. vulgaris*, als *B. lamatogona*, *B. procumbens*) und Zuckerrübenhybriden (z.B. monosome Additionslinie und Fragmentadditionslinie) erfolgreich angewendet. Auch aus Blattmaterial anderer Gattungen wie z.B. *Arabidopsis thaliana* (Abb. 2B), *Zea mays* (Abb. 2D), *Antirrhinum majus* (Kap.3.5.2) und *Cicer arietinum* (Kap.3.5.1.2.) wurden Chromosomenpräparate durch Auftropfen der Kernsuspension hergestellt. Die Eignung der Präparate für den Einsatz in der

Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung wurde durch Nachweis der ribosomalen RNA-Gensequenzen durch FISH in den verschiedenen Präparaten überprüft (Abb. 2B-D).

3.1.2. Darstellung einer vollständigen Meiose in *B. vulgaris*

Die Präparation meiotischer Chromosomen erfolgte aus jungen Antheren, in denen die Meiose noch nicht beendet war. Am oberen Ende junger Blütenstände der Zuckerrübe befinden sich die hellen, kleinen Antheren, in denen die Pollenmutterzellen (PMC) frühe meiotischen Teilungsstadien durchlaufen. In den sich gelblich färbenden Antheren ist die Meiose bereits beendet, und es sind ausschließlich Mikrosporen und Perpetuumzellen vorhanden.

Für das Auffinden der geeigneten Teilungsstadien im Blütenstand für hochauflösende FISH-Experimente ist eine genaue Kenntnis der meiotischen Stadien notwendig. Die Chromosomenmorphologie variiert zwischen Pflanzengattungen, so dass schematisierte Lehrbuchzyklen nicht genügen, um Teilungsstadien der Gattung *Beta* eindeutig und ausreichend für weitere FISH-Analysen zu charakterisieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein vollständiger Atlas der Meiose der Zuckerrübe *B. vulgaris* erstellt (Abb. 3). Diese Übersicht ermöglichte eine klare Charakterisierung der Stadien, beschleunigte die Suche nach Teilungsstadien erheblich und war für die Auswertung der Ergebnisse notwendig.

Die Chromosomenstadien in den Pollenmutterzellen wurden vier meiotischen Phasen zugeordnet, die als frühe Prophase I (1), späte Prophase I (2), erste Teilungsphase (3) und zweite Teilungsphase (4) bezeichnet wurden. In jedem meiotischen Abschnitt konnten charakteristische Chromosomen- und Kernstrukturen beobachtet werden, die in Abb. 3 dargestellt und in den folgenden Abschnitten 1 bis 4 detailliert beschrieben werden.

1. Prophase I:

Die frühe Prophase I ist durch Erkennung und Paarung der homologen Chromosomen charakterisiert.

- a) Präleptotän (Abb. 3-1a): In sich entwickelnden Antheren mit einer Länge von ca. 0,25-0,30 mm liegen die Chromosomen weitgehend dekondensiert vor. Distinkte, stark DAPI-positive Blöcke (Chromozentren) repräsentieren pericentromerisches oder interkalares Heterochromatin und die nukleoläre Organisationsregion (NORs, *nucleolar organization regions*). Eine größere kreisförmige, DAPI-negative Region repräsentiert den Nukleolus. Am Ende des Präleptotäns vergrößern die PMC ihr Volumen um etwa das 3-fache und die Chromatinstrukturen erscheinen verfeinert.

- b) Leptotän (Abb. 3-1b): Jedes Leptotänchromosom besteht aus zwei Schwesterchromatiden. In Antheren einer Länge von ca. 0,35-0,40 mm lassen sich zahlreiche ungepaarte fädige Chromosomen beobachten. Der Nukleolus ist deutlich in der Mitte des Netzwerkes zu erkennen. Heterochromatische Regionen fusionieren und bilden stark DAPI-positive Zentren, die sich am Ende des Leptotäns in einer Hälfte des Nukleus zusammenlagern.
- c) Zygotän (Abb. 3-1c): In Antheren einer Länge von ca. 0,45-0,50 mm kondensiert das Chromatin in einem zentralen Bereich. Das Chromatin bildet einen dichten Knoten, aus dem gepaarte und ungepaarte euchromatische Chromosomen in das Nukleoplasma reichen. Der Nukleolus ist peripher lokalisiert und noch deutlich erkennbar (Abb. 2-1c Pfeil).
- d) Frühes Pachytän (Abb.3-1d): Der Knoten lockert sich und die Chromosomen breiten sich im gesamten Nukleus aus. Die aus dem Knoten herausragenden Chromosomen sind dicker und zeigen eine deutliche Doppelstruktur. Der Nukleolus ist nicht mehr sichtbar. Als stark DAPI-positives Chromosomenende ist die NOR erkennbar (Abb. 2-1d Pfeil). Über die starke terminale DAPI-Färbung kann dieses Bivalent als Chromosomenpaar 1 identifiziert werden.
- e) Pachytän (Abb. 3-1e): In Antheren mit einer Länge von ca. 0,50-0,70 mm ist die Assoziation und Paarung der homologen Chromosomen abgeschlossen. Die Chromosomen sind vollständig über den synaptonemalen Komplex verbunden. Der Chromatinknoten ist aufgelöst und individuelle Bivalente können identifiziert werden. Jedes Bivalent hat pericentromerische und interkalare, stark DAPI-gefärbte heterochromatische Regionen. Ein Pachytänchromosom ist bei *B. vulgaris* 20-30-mal länger als ein Metaphasechromosom der Mitose (nach Vermessung von sechs Pachytänchromosomen von *B. vulgaris*).

2. Späte Prophase I

Die späte Prophase I ist charakterisiert durch Verkürzung und zunehmende Kondensation der Chromosomenpaare.

- a-b) Frühes Diplotän (Abb. 3-2ab): Der synaptonemale Komplex zwischen homologen Chromosomen ist bis auf einige Verbindungsstellen aufgelöst. Die Bivalente zeigen eine „fransige“ Struktur. Der Kern scheint durch einzelne Chromosomen ausgefüllt.
- c) Spätes Diplotän (Abb. 3-2c): In dem fädigen Netzwerk lassen sich zunehmend diskreter werdende Bivalente erkennen. Die euchromatischen Chromosomenenden erscheinen weiterhin dekondensiert.

- d) Diakinese (Abb. 3-2d): In den stark kondensierten Bivalenten sind heterochromatische Blöcke im pericentromerischen Bereich von euchromatischen Regionen an den Chromosomentermi zu unterscheiden. Ringbivalente mit Chiasmata in beiden Chromosomenarmen und Stabbivalente mit einem Chiasma sind sichtbar.

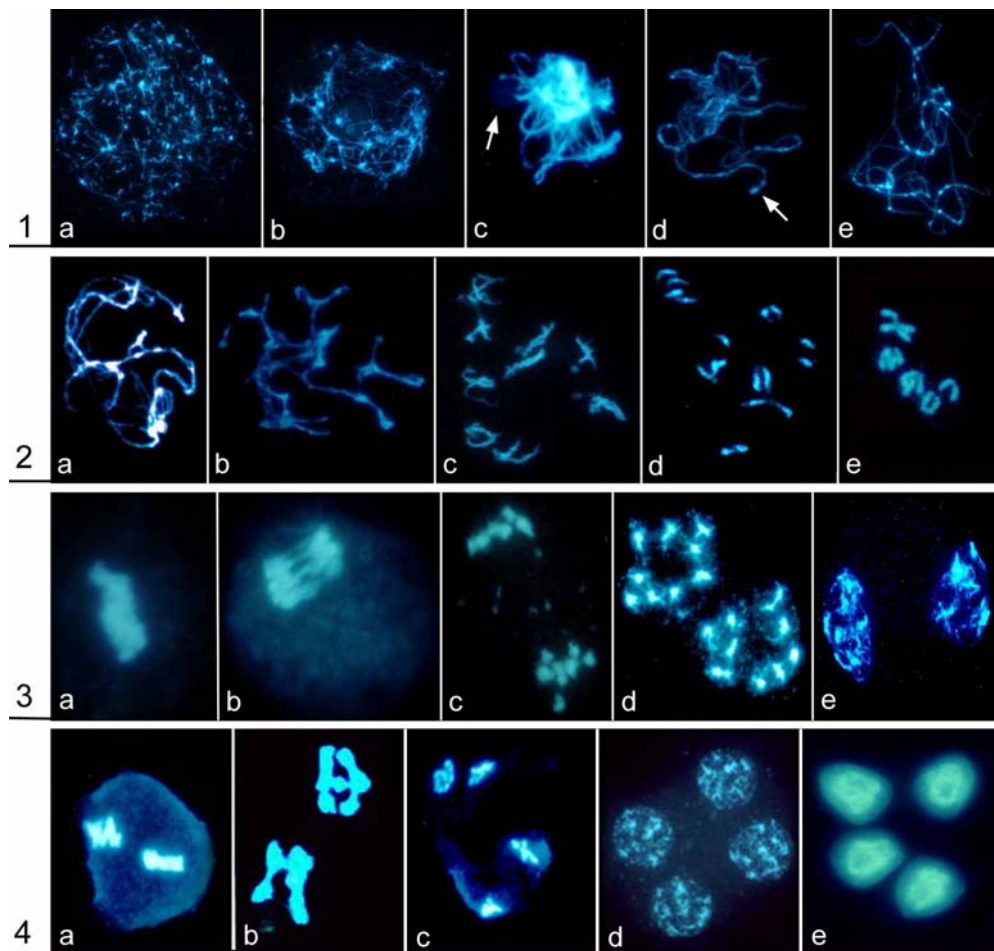


Abb. 3: Charakterisierung der Meiosestadien von Pollenmutterzellen (PMC) aus jungen *Beta*-Antheren nach DAPI-Färbung:

- Die frühe **Prophase I** ist durch Erkennung und Paarung der homologen Chromosomen charakterisiert.
(a) Präleptotän, (b) Leptotän, (c) Zygotän, (d) frühes Pachytän, (e) Pachytän. Im Zygotän ist der Nukleolus peripher lokalisiert (c Pfeil). Als stark DAPI-positives Chromosomenende ist die NOR im frühen Pachytän erkennbar (d Pfeil).
- Die **späte Prophase I** ist charakterisiert durch Verkürzung und zunehmende Kondensation der Chromosomenpaare.
(a-b) Frühes Diplotän, (c) spätes Diplotän, (d) Diakinese, (e) späte Diakinese
- Die **erste Teilungsphase** ist durch Segregation homologer Chromosomen auf zwei haploiden Kerne gekennzeichnet. (a) Metaphase I, (b) frühe Anaphase I, (c) Telophase I, (d-e) Interkinese (Prophase II).
- Die **zweite Teilungsphase** ist durch die Trennung der Chromatiden charakterisiert.
(a) Metaphase II, (b) Anaphase II, (c) Telophase II, (d) Tetrade, (e) haploide Mikrosporen.

- e) Späte Diakinese (Abb. 3-2e): Hetero- und euchromatische Regionen lassen sich nicht mehr differenzieren. Das NOR-tragende Bivalent ist durch DAPI-Färbung nicht zu identifizieren. Die Bivalente beginnen sich zentral zu gruppieren.

3. Erste Teilungsphase

Die erste Teilung ist durch die Segregation homologer Chromosomen auf zwei haploide Kerne gekennzeichnet.

- a) Metaphase I (Abb. 3-3a): Die maximal kondensierten Bivalente richten sich in der Äquatorialebene des Spindelapparats aus.
- b) Frühe Anaphase I (Abb. 3-3b): Die homologen Chromosomen weichen auseinander und werden zu den Spindelpolen gezogen.
- c) Telophase I (Abb. 3-3c): Zwei polare Gruppen von je neun stark kondensierten Chromosomen sind zu erkennen.
- d-e) Interkinese (Prophase II) (Abb. 3-3de): Neun partiell dekondensierte Chromosomen mit stark DAPI-positiven Zentren und fädigen Rändern liegen in zwei eng benachbarten haploiden Kernen vor.

4. Zweite Teilungsphase

Die zweite Teilung ist durch die Trennung der Chromatiden charakterisiert.

- a) Metaphase II (Abb. 3-4a): Zwei Gruppen von je neun stark kondensierten Chromosomen sind in zwei eng benachbarten Kernen zu erkennen.
- b) Anaphase II (Abb. 3-4b): Die Chromatiden trennen sich und bewegen sich auf die Spindelpole zu.
- c) Telophase II (Abb. 3-4c): Vier Gruppen mit je neun sich dekondensierenden Chromatiden liegen vor.
- d) Tetrade (Abb. 3-4d): Die neun Chromosomen dekondensieren und das Chromatin zeigt die typische komplexe Struktur eines Interphasekerns.
- e) (Abb. 3-4e) Aus den vier haploiden Interphasekernen bilden sich vier haploide Mikrosporen.

3.1.3. Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung an gestreckten Chromatin-Fäden

Das Auflösungsvermögen der FISH an kondensierten Metaphasechromosomen ist limitiert und eignet sich nicht zur Bestimmung kleinerer physikalischer Abstände zwischen zwei DNA-Sonden. Loci mit einem geringeren Abstand als 1 Mb sind optisch auf Metaphasechromosomen nicht differenzierbar. Meiotische Chromosomen, insbesondere Pachytänchromosomen, sind weniger kondensiert, und Loci mit Abständen bis 50 kb können

in pflanzlichem Material unterschieden werden (FLORIJN *et al.*, 1996; RAAP *et al.*, 1996). Eine nahezu lineare Auflösung chromosomaler Strukturen bieten gestreckte Chromatinfasern (*extended chromatin fibres*, ECF), die eine direkte optische Feinkartierung physikalisch sehr eng gekoppelter Sequenzen (Distanzen kleiner 1 kb) ermöglichen (FAN *et al.*, 1990; FLORIJN *et al.*, 1995; FRANSZ *et al.*, 1996a).

Für die Präparation von gestreckten Chromatinfasern wurde eine Zellkernsuspension aus jungem Blattgewebe hergestellt. Zwei bis drei Tropfen der Suspension (5×10^6 Kerne pro Milliliter) wurden entlang der kurzen Seite eines Objektträgers aufgetragen. Anschließend erfolgte die Lyse der Kerne durch Zugabe eines ionischen Detergenz (0,5% SDS). Nach Kippen des Objektträgers in einem Winkel von 30° bis 45° konnte der Tropfen mit den lysierten Kernen langsam über den Objektträger abfließen. Dadurch wurde aus den Kernen das Chromatin freigesetzt und entlang der Glasoberfläche gestreckt. An den entstandenen Chromatinfäden läßt sich anschließend eine *in situ*-Hybridisierung mit DNA-Sonden durchführen. Dieses Verfahren der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung an gestreckten Chromatinfasern wird *fibre*-FISH bezeichnet.

Zunächst wurde die *fibre*-FISH mit DNA-Sonden für die repetitiv angeordnete ribosomale DNA (pXV1, p18S; ITS: Kap.4.1.3) etabliert und die maximal detektierbare DNA-Länge sowie die Spezifität der Signale ermittelt und überprüft.

Die für die 5S rRNA und die 18S-5,8S-25S rRNA kodierenden Gene sind im pflanzlichen Genom als Multigenfamilien organisiert. Ihnen gemeinsam ist die Anordnung in chromosomalen Blöcken aus tandemartig angeordneten Einheiten, bestehend aus den eigentlichen Genen sowie den intern transkribierten und intergenen Spacern mit regulatorischen Sequenzen.

Der Klon pXV1, der die vollständige Sequenz eines 5S rRNA-Gens und des intergenen Spacers der Zuckerrübe enthält, wurde auf Chromatinfäden aus *B. vulgaris* hybridisiert. Die Länge der linear angeordneten Signale wurde in Bildfolgen mit bis zu 13 sich überlagernden Photographien, auf denen Signalpunkte über einem Bereich von ca. 800 μm dokumentiert wurden, ausgemessen. Die Längenbestimmung der Signallinien wird durch Überkreuzen oder Übereinanderlagerung der Signale erschwert bzw. verhindert. Am Beginn bzw. Endpunkt einer Chromatinfaser ist die Fluoreszenzintensität oft gering und die Signale sind diffus. Sehr stark verkürzte Signalfolgen werden durch gebrochene Chromatinfasern verursacht. Sie wurden nicht in die Auswertung einbezogen. Die zur Auswertung verwendeten Daten stammen von separat lokalisierten Signalen, und die angegebenen Messwerte repräsentieren

nur die Länge der eindeutig zusammenhängenden Bereiche. Der Streckungsfaktor variierte in verschiedenen Bereichen eines Präparates und zwischen den Präparaten, da die Lyse der Kerne und die Streckung des Chromatins nicht homogen erfolgte. Die errechneten Werte können daher nur Abschätzungen sein.

Linear angeordnete und nicht unterbrochene Hybridisierungssignale wurden über eine Länge von $260 \pm 69 \mu\text{m}$ (Mittelwert \pm Standardabweichung; $n = 22$) detektiert. Einige Signallinien ($n = 4$) zeigten eine Länge von ca. $600 \pm 20 \mu\text{m}$. Eine Zusammenlagerung zweier Chromatinfasern könnte diese langen Signalfolgen verursachen. Auszuschließen ist allerdings nicht, dass durch vollständige Lyse von Kernmembran und nukleärer Matrix sowie einer optimalen Fließgeschwindigkeit des freigesetzten Chromatins entlang des Objektträgers überdurchschnittlich lange DNA-Fäden entstanden sind. Diese auch in Wiederholungsversuchen immer wieder zu beobachteten langen Signalfolgen könnten demnach einen Hinweis auf die tatsächliche Länge der 5S rRNA geben. Legt man den durch FRANSZ *et al.* (1996a) bestimmten Streckungsfaktor von $3.27 \text{ kb}/\mu\text{m}$ zugrunde, so lassen sich die tandemartig angeordneten 5S rRNA-Gene über eine Länge von $850 \pm 330 \text{ kb}$ nachweisen, wobei einige Daten auf eine mögliche Länge von ca. 1900 kb hinweisen.

Die Ergebnisse zeigen, dass Signale an Chromatinfasern über eine Länge von durchschnittlich $260 \mu\text{m}$ (850 kb) detektiert werden können. Gebrochene oder übereinandergelagerte Chromatinfäden, eine zu geringe Signalintensität oder eine verringerte Streckung des Chromatins beeinflussen die Ergebnisse der *fibres*-FISH und begrenzen die Einsatzmöglichkeiten der Methode. Die Analyse der Daten erfordert daher eine besonders kritische Betrachtung der Spezifität der Signale.

Die Spezifität der durch *fibres*-FISH erzeugten Hybridisierungssignale wurde durch ein Testsystem verifiziert. Durch die Hybridisierung von zwei eng benachbarten Fragmenten der tandemartig angeordneten 18S-5,8S-25S rRNA-Gene wurden die detektierten Signalpunkte auf den Chromatinfasern überprüft. Die notwendigen DNA-Sonden waren ein am 3'-Ende des 18S rRNA-Gens lokalisiertes genomisches Fragment und ein angrenzendes Fragment des intern transkribierten Spacers (ITS). Das ITS-Fragment wurde durch PCR mit ITS-Primern (ITS2 und ITS5, Kap.4.1.3) aus genomischer DNA der Zuckerrübe amplifiziert. Eine erwartete alternierende Reihenfolge der Signale beider DNA-Sonden konnte entlang der Chromatinfasern beobachtet werden (Abb. 4A). Dies bestätigte die Spezifität der Hybridisierungssignale und erlaubt den Einsatz dieses Verfahrens zur Genomanalyse der *Beta*-Arten.

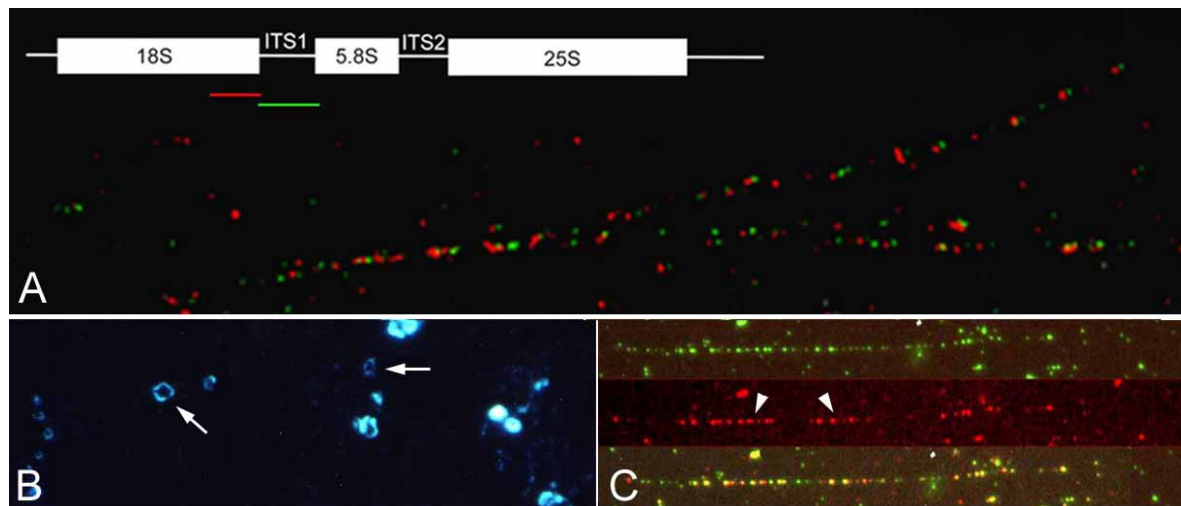


Abb. 4: (A) FISH an gestreckten Chromatinfasern der Translokationslinie von *B. vulgaris* (A906001): Doppelhybridisierung von zwei eng gekoppelten Sequenzen der tandemartig angeordneten 18S-5,8S-25S rDNA zur Verifizierung der Spezifität. Die Position der zu den Hybridisierungssonden komplementären chromosomalen Sequenzen sind im Schema eingezeichnet (Digoxigenin-markierte ITS1- und Biotin-markierte 18S rDNA-Sequenz). Analog zur schematischen Anordnung der Zielsequenz sind auf den Chromatinfasern alternierende rote und grüne Signale detektierbar.

(B-C) **Physikalische Kartierung eines BAC-Klons:** (B) DAPI-Färbung von auf Objektträgern immobilisierten zirkulären BAC-Molekülen (Pfeile). (C) FISH an linearisierter BAC-Moleküle mit Gesamt-BAC-DNA (grün, oben) und pTS5-Satellitenrepeat (rot, Mitte, Pfeilköpfe) als Sonde. Die digitale Übereinanderlagerung beider Hybridisierungsmuster (unten) verdeutlicht die Anordnung der pTS5-Repeats entlang der Gesamt-BAC-DNA. Die Insertion besteht aus mehreren großen pTS5-Repeatblöcken.

3.1.4. Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung an BAC-Molekülen

Nach Einführung der *fibres*-FISH in die *Beta*-Genomanalyse wurden Experimente durchgeführt, in denen BAC-Moleküle (*bacterial artificial chromosomes*) als Hybridisierungstargets verwendet wurden. In unserer Arbeitsgruppe wurde eine BAC-Bank aus der Linie PRO1 im Vektor pBeloBAC11 erstellt (GINDULLIS *et al.*, 2001). Es stellte sich die Frage, ob durch FISH die optische Kartierung ausgewählter Sequenzen sowie die Bestimmung ihrer Anordnung in der genomischen Insertion eines BAC-Klons möglich ist.

Die Versuche wurden exemplarisch am BAC-Klon 406A8 durchgeführt. Der Klon wurde durch Koloniehybridisierung mit dem Satelliten-Repeat pTS5 selektiert. Die BAC-DNA wurde nach einem modifizierten Protokoll (GINDULLIS *et al.*, 2001) mit dem Plasmid-Midi-Kit (Qiagen) isoliert und über eine Qiagen-Tip100-Säule gereinigt. Bei schonender Isolierung bleibt die BAC-DNA, wie durch Pulsfeldgelelektrophorese nachweisbar war, weitgehend intakt. In einem ersten Schritt wurden die BAC-Moleküle auf Poly-L-Lysin beschichtete

Objektträger immobilisiert. Die bei der Ausbreitung der DNA über den Objektträger wirkenden Scherkräfte verursachen Doppelstrangbrüche und die dadurch linearisierten BAC-Moleküle werden gestreckt. Nach Fixierung und Wärmebehandlung wurden die Präparate durch DAPI-Färbung kontrolliert und für eine FISH-Analyse eingesetzt. Intakte zirkuläre BAC-Moleküle, die auf ein sehr schonendes Präparationsverfahren hinweisen, wurden nach DAPI-Färbung auf den Präparat ebenfalls nachgewiesen (Abb. 4B Pfeile).

Für die FISH-Analyse wurde zunächst die DNA des gesamten BACs 406A8 mit Digoxigenin-dUTP markiert und als Sonde eingesetzt. Dadurch wurden die Gesamtlänge der Hybridisierungssignale des BACs mit der Größenbestimmung nach Pulsfeldgelelektrophorese (130-140 kb) korreliert und ein Streckungsfaktor des gestreckten Chromatins errechnet. In dem in Abb. 3C dargestellten Beispiel wurde ein Streckungsfaktor von 3,6 kb/ μm ermittelt. Dieser Wert liegt nur gering über den für die Streckung von Chromatinfäden aus Zellkernen errechneten Wert von 3,27 kb/ μm (FRANZ *et al.*, 1996a). Die BAC-Moleküle konnten etwas weniger gestreckt werden, was wahrscheinlich auf die unterschiedlichen Verfahren zur Streckung der DNA zurückzuführen ist. Die Streckung der BAC-Moleküle erfolgte sehr schonend durch Ziehen eines Deckgläschen über den mit der DNA-Lösung benetzten Objektträger. Die Chromatinfäden wurden durch Herabfließen eines Flüssigkeitstropfen entlang des Objektträgers gestreckt.

Die vorangegangene molekulare Charakterisierung hatte ergeben, dass große Abschnitte des BACs 406A8 aus pTS5-Satelliten-DNA bestehen (F. GINDULLIS, pers. Mitteilung). Um die Größe dieser Regionen zu ermitteln, wurden die Präparate simultan mit der Gesamt-BAC-Sonde und einer diffentiell markierten pTS5-Sequenz hybridisiert. Die Gesamt-BAC-Sonde markiert das vollständige BAC-Molekül in lokal variierender Intensität. Die detektierten pTS5-Satellitenarrays sind mehrfach unterbrochen. Die Insertion besteht aus mehreren großen pTS5-Repeatblöcken, zwischen denen nicht homologe Sequenzen lokalisiert sind. Der größte pTS5-Satellitenblock hat eine Länge von rund 28 kb (Abb. 4C).

Die Ergebnisse zeigen, dass durch mikroskopische Analyse der genomischen DNA der BACs die Organisation von eng gekoppelten Sequenzen ermittelt und eine Längenabschätzung durchgeführt werden kann. Hochauflösende Verfahren der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung können zur physikalische Kartierung von BAC-Klonen eingesetzt werden und somit wesentlich zur Genomkartierung der *Beta*-Arten beitragen.

3.2. Analyse der Genomstruktur der Zuckerrübe *Beta vulgaris* durch Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung

Eine genaue Kenntnis der Genomorganisation der Zuckerrüben *B. vulgaris* ist Voraussetzung für die Untersuchungen von durch interspezifische Kreuzungen entstandenen Zuckerrübenhybride. Für vergleichende Analysen von Hybridgenomen (z.B. monosomen Additionslinien oder Fragmentadditionslinien) sind strukturelle Untersuchungen der Elterngenome notwendig. Ein Modell der Chromosomenstruktur, das die Loci und die Organisation der für *B. vulgaris* charakterisierten Sequenzfamilien entlang eines Chromosomes darstellt, wurde von SCHMIDT & HESLOP-HARRISON (1998) entwickelt. Jedoch musste in einem schematisierten Chromosomenstrukturmodell unberücksichtigt bleiben, dass repetitive Sequenzen auf einzelnen Chromosomen in stark unterschiedlichen Amplifikationsgraden vorliegen. Eine variierende Anzahl von Repeatkopien auf den Chromosomen führt bei einem Nachweis durch FISH zu einer chromosomenspezifische Signalverteilung. Um Möglichkeiten der Identifizierung von Chromosomen im *B. vulgaris*-Genom durch Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung zu überprüfen, wurden Hybridisierungsmuster von nicht-homologen repetitiven DNA-Sequenzen durch *multi-colour* FISH miteinander kombiniert und analysiert. Die Ergebnisse, die zu einer Differenzierung von *B. vulgaris*-Chromosomen beitragen, werden in Kapitel 3.2.1. dargestellt. Für die Karyotypanalyse wurden repetitive Sequenzen auf mitotischen Metaphasechromosomen und langgestreckten Pachytänchromosomen lokalisiert. Die Lokalisierung und genaue Positionierung eng benachbarter DNA-Sequenzen auf Pachytänchromosomen erlaubt die Erstellung einer Feinstruktur des Chromosomenmodells. Um eine exakte Bestimmung der Chromosomenstadien zu gewährleisten, wurde das Verhalten der *Beta*-Chromosomen in der frühen Meiose analysiert (Kap.3.2.2.).

Weiterhin kann das Chromosomenmodell durch eine genaue Untersuchung funktionell wichtiger Chromosomenabschnitte vervollständigt werden. Dies ist durch *in situ*-Hybridisierung an gestreckten Chromatinfäden (*fibres*-FISH) möglich. Die Anordnung repetitiver Sequenzen in terminalen Chromosomenregionen von *B. vulgaris* wurde durch Hybridisierung an gestreckte Chromatinfasern ermittelt (Kap.3.2.3.).

3.2.1. Identifizierung von Chromosomen durch das Hybridisierungsmuster repetitiver Sequenzen

Die Chromosomen der Zuckerrübe sind relativ klein und morphologisch sehr ähnlich. Eine Identifizierung individueller Chromosomen durch klassische cytologische Färbetechniken

(z.B. C- und G-Banding) führte bisher nicht zu einem eindeutigen Standardkaryogramm der Metaphasechromosomen von *B. vulgaris*. Idiogramme der Zuckerrübe, die z.B. an Metaphasechromosomen (BOSEMARK & BORMOTOV, 1971), Prometaphasechromosomen (LÖPTIEN, 1985), Pachytänchromosomen (NAKAMURA & TSUCHIYA, 1982; DE JONG, 1981) oder an haploiden Pflanzen (CISTUE *et al.*, 1985) durch Analyse der Chromomerenmuster und Längenmessungen erstellt wurden, erwiesen sich für eine Identifizierung individueller Chromosomen nicht brauchbar. Die Karyotypanalyse wird erschwert durch große Variationen der totalen chromosomalen Längen, der Verhältnisse der Armlängen zueinander oder der Verteilung von Hetero- und Euchromatin in verschiedenen Fixierungen (variierender Kondensationsgrad der Chromosomen) oder Präparationen (unterschiedlich starke Spreitung). Die absoluten Chromosomenlängen in *B. vulgaris* unterscheiden sich bei sehr stark kondensierten Chromosomen kaum. Bei dekondensierten Chromosomen behindern Verkrümmungen und Überschneidungen der Chromosomenarme die Längenmessungen. Die distalen euchromatischen und schwach DAPI-gefärbten Regionen und die häufig V-förmig auseinanderragenden Chromatiden verursachen ebenfalls Fehler bei der Längenbestimmung.

Die Ermittlung der totalen chromosomalen Längen und Armlängenrelationen (q/p: q: langer Arm; p: kurzer Arm) der *B. vulgaris*-Chromosomen wurde mit Hilfe des Längenmessprogramms für Chromosomen „Micro Measure 3.3“ (REEVES, 2001) durchgeführt und bestätigte 18 relativ gleichlange, metazentrische Chromosomen im Zuckerrübengenom. Es wurden Metaphasen mit sehr unterschiedlichen Kondensationsgraden der Chromosomen ausgewertet. Um Messfehler auszuschließen wurden Doppel- bzw. Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die chromosomalen Längen variierten 8% um den Mittelwert aller Chromosomenlängen in einer Metaphase. Das Verhältnis der Armlänge betrug $1,22 \pm 0,11$ (Mittelwert \pm Standardabweichung; $n = 378$) bei einer mittleren Abweichung von $\pm 0,08$. Alle *B. vulgaris* Chromosomen besitzen eine Centromerposition innerhalb der medianen Region (mediane Region: $q/p > 1,0-1,7$ nach TRAUT, 1991).

Da die Grenzen der schwach DAPI-gefärbten Chromosomenenden wie oben erwähnt schwer detektierbar sind und während der Betrachtung im Mikroskop unter UV-Bestrahlung schnell verblassen (*fading*), wurden die Chromosomenenden mit einer heterologen Telomersonde (pLT11) aus *A. thaliana* durch FISH markiert (RICHARDS & AUSUBEL, 1988). Für die exakte Berechnung der Armlängenrelationen wurde simultan die Centromerposition mit dem pericentromerisch lokalisierten *Bam*HI-Satellitenrepeat pBV1 detektiert. Durch Markierung der Centromere und Telomere sollten Fehler der Längenbestimmung reduziert und eventuelle Längendifferenzen der Chromosomen aufgedeckt werden. Allerdings wurden ebenfalls nur 18

relativ gleichlange, metazentrische Chromosomen im Zuckerrübenchromosom nachgewiesen. Bestätigt wurde daher die exakte Messung der DAPI-gefärbten Chromosomen.

Eine individuelle Markierung und Identifizierung von Chromosomenpaaren war durch Einsatz von chromosomenspezifisch hybridisierenden DNA-Sonden in der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung möglich. Durch den Nachweis der ribosomalen Gene konnten einzelne Chromosomenpaare erfolgreich identifiziert werden (SCHMIDT *et al.*, 1994). In *B. vulgaris* sind die Gene für die 5S rRNA centromernah auf dem kurzen Arm eines Chromosomenpaares angeordnet. Es war möglich, Chromosom 4 von *B. vulgaris* durch *in situ*-Hybridisierung einer 5S rRNA-Sonde zu identifizieren (SCHONDELMAIER *et al.*, 1997). Die 18S-5,8S-25S rRNA-Gensequenzen sind terminal auf Chromosom 1 von *B. vulgaris* lokalisiert. Lichtmikroskopisch ist Chromosom 1 durch das Vorhandensein einer sekundären Einschnürung in qualitativ guten Chromosomenstadien ohne spezifische Markierung erkennbar. Durch Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung mit einer heterologen DNA-Sonde aus Weizen (pTA71, GERLACH & BEDROCK, 1979) konnte Chromosom 1 im Interphase- und Metaphasekern eindeutig lokalisiert (Abb. 2B) (SCHMIDT *et al.*, 1994).

Damit sind Chromosom 1 und Chromosom 4 durch *in situ*-Hybridisierung mit rDNA-Sonden identifizierbar. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Hybridisierungsmuster der in Tab.5 aufgeführten repetitiven Sequenzen an Chromosomen von *B. vulgaris* untersucht. Chromosomenspezifische Signalmotive sollten durch Vergleich mitotischer und meiotischer Chromosomen, sowie *multi-colour* FISH und Rehybridisierung von Chromosomenpräparaten aufgezeigt werden.

Tab. 5: DNA-Sonden, die für die Identifizierung von *B. vulgaris*-Chromosomen eingesetzt wurden.

DNA-Sonde	Zielsequenz	Referenz
pTA71	18S-5,8S-25S rRNA-Gene; terminal auf Chromosom 1 von <i>B. vulgaris</i>	GERLACH & BEDROCK, 1979
pXV1	5S rRNA-Gene; pericentromerisch auf Chromosom 4 von <i>B. vulgaris</i>	SCHMIDT <i>et al.</i> , 1994
pEV1	interkalares Satellitenrepeat in <i>B. vulgaris</i>	SCHMIDT <i>et al.</i> , 1998
pBV1	pericentromerisches Satellitenrepeat in <i>B. vulgaris</i>	SCHMIDT & METZLAFF, 1991
pAV34	subtelomerisches Satellitenrepeat aus <i>B. corolliflora</i>	JANSEN, 1999
pAN163	interkalares Satellitenrepeat aus <i>B. corolliflora</i>	JANSEN, 1999

Das *Eco*RI-Satellitenrepeat pEV1 ist in unterschiedlichen Amplifikationsgraden auf den Chromosomen lokalisiert. Nach Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung des pEV1-Repeats wurden Signale unterschiedlicher Intensität auf den Chromosomen detektiert. Die Analyse der pEV1-Hybridisierungssignale auf Chromosomen von drei mitotischen Metaphasen (Abb. 5A,B und C) und zwei dekondensierten meiotischen Pachytänstadien (Abb. 5D-E) führte zu einer Differenzierung zwischen Chromosomen. Sowohl die chromosomale Position, als auch die unterschiedliche Intensität und die Anzahl der Signale ermöglichte eine Zuordnung der 18 Chromosomen von *B. vulgaris* in vier Gruppen, die I bis IV bezeichnet wurden.

Gruppe I (Abb. 5I):

Auf je sechs Metaphasechromosomen und je drei Pachytänchromosomen wurden starke pEV1-Signale auf beiden Chromosomenarmen detektiert. Die stark kondensierten Metaphasechromosomen (Abb. 5I M_A, M_B und M_C) zeigen eng benachbarte, starke Signale (rote Fluoreszenz). Die Hybridisierungsmuster der drei Pachytänchromosomen (Abb. 5I P_D und P_E) lassen erkennen, dass auf beiden Chromosomenarmen zwei Blöcke des Satellitenrepeats (Abb. 5I P_D: grüne Fluoreszenz, Abb. 5I P_E: rote Fluoreszenz) im interkalaren Heterochromatin vorliegen (stark DAPI-gefärbte Chromosomenregionen; Abb. 5I P_D und Abb. 5I P_E: blaue Fluoreszenz: jeweils unterhalb der hybridisierten

Chromosomen dargestellt). Pericentromerisches Heterochromatin wurde dagegen durch pEV1 nicht markiert.

Gruppe II (Abb. 5II):

Deutliche Hybridisierungssignale des *Eco*RI-Satelliten auf einem Chromosomenarm und wenige, sehr schlecht detektierbare Repeatkopien auf dem anderen Arm kennzeichneten zwei Chromosomenpaare. Auf je vier Chromosomen der Metaphasen M_A , M_B und M_C läßt sich jeweils ein Signal auf jeden Chromosomenarm erkennen. Signale auf dem Pachytänchromosomen in Abb. 5II P_E (rote Fluoreszenz) zeigen zwei eng benachbarte Satellitenblöcke je Chromosomenarm. An den Pachytänchromosomen in Abb. 5II P_D (grüne Fluoreszenz), die stärker kondensiert vorlagen, wurde wiederum nur ein starkes Signal je Arm detektiert. Dies zeigt, dass beide Satellitenblöcke sehr eng benachbart vorliegen und eine Differenzierung nur an stark decondensierten Chromosomen möglich ist.

Gruppe III (Abb. 5III):

Ein Chromosomenpaar wurde dadurch charakterisiert, dass deutlich erkennbaren pEV1-Signale auf den beiden Chromosomenarmen mit sehr unterschiedlicher Fluoreszenzintensität zu beobachten waren. Im Gegensatz zu den Chromosomen der Gruppe II, die auch eine asymmetrische Verteilung der Satellitenrepeats auf den Chromosomenarmen aufweisen, ist in Gruppe III das schwächere Signal immer deutlich detektierbar. Durch die Hybridisierung an den Pachytänchromosom in Abb. 5III P_E (rote Fluoreszenz) wird ein weiterer Unterschied zu Gruppe II-Chromosomen deutlich. Zwei eng benachbarte große pEV1-Satellitenblöcke auf einem Chromosomenarm und ein großer Satellitenblock auf dem anderen Arm waren zu erkennen. Auf den Chromosomen der Gruppe II dagegen wurden zwei große und zwei kleine Satelliten-Blöcke detektiert (Abb. 5II P_E , rote Fluoreszenz).

Gruppe IV(Abb. 5IV):

Schwache Signale auf beiden Chromosomenarmen, die meist ebenfalls eine unterschiedliche Signalintensität aufwiesen, besaßen drei weitere Chromosomenpaare. Die Intensität der Signale dieser sechs Metaphasechromosomen (Abb 5IV M_A , M_B und M_C) variiert je nach Präparat. Die Permeabilität der Präparate und damit der Zugang der DNA-Sonde zur Chromosomen-DNA scheint die Hybridisierung an die kleineren pEV1-Satelliten-Blöcke der Chromosomen aus Gruppe IV stark zu beeinflussen. An den drei Pachytänchromosomen (Abb. 5IV P_D und P_E) sind die Hybridisierungssignale nur schwach

detektierbar. Die Chromosomen der Gruppe IV sind eindeutig von den Chromosomen der anderen Gruppen differenzierbar. Chromosomenpaare innerhalb der Gruppe sind allerdings nicht zweifelsfrei identifizierbar.

Abb. 5: Hybridisierungsmuster des interkalaren *Eco*RI-Satelliten pEV1 auf Chromosomen der Metaphase (A-C rot) und des Pachytänstadium (D grün, E rot). Auf den Pachytänchromosomen wurde simultan die 5S rDNA (D gelb) mit einer biotinmarkierten Sonde (pXV1, orange, Pfeil) lokalisiert. Weiterhin wurde zur Verifizierung der Centromerposition der *Bam*HI-Satellit pBV1 (E grün) als Sonde eingesetzt. Der pBV1-Satellit ist pericentromerisch und demnach zwischen beiden *Eco*RI-Satellitenblöcken (rot) lokalisiert.

In D und E sind jeweils rechts die DAPI gefärbten Chromosomen abgebildet.

[Die Darstellung der Metaphasen A-C erfolgte im „LAYER/COLOR“ Modus (Photoshop)].

Einteilung der Chromosomen in die Gruppen I-IV:

Die Chromosomen, der oben dargestellten Metaphasen aus A, B und C (**M_A, M_B und M_C**) und den Pachytänstadien E und D (**P_D und P_E**), wurden nach ihren pEV1-Hybridisierungsmustern den vier Gruppen **I, II, III und VI** zugeordnet. Die Kriterien für die Gruppenzuordnung waren: **I** - starke Signale auf beiden Armen; **II** - ein sehr schwaches und ein starkes Signal je Chromosomenarm; **III** - deutliche, aber unterschiedlich starke Signale auf beiden Armen; **IV** - schwache Signalintensitäten auf beiden Armen.

Die **Nummerierung** der Metaphasechromosomen kennzeichnet jeweils nur ihre Position in den oberen Abbildungen A-C.

In P_D und P_E wurden jeweils die DAPI-gefärbten Chromosomen unterhalb der Hybridisierungsmuster dargestellt. Die Hybridisierung der pEV1 und pBV1-Sonde in den heterochromatischen Regionen ist zu erkennen.

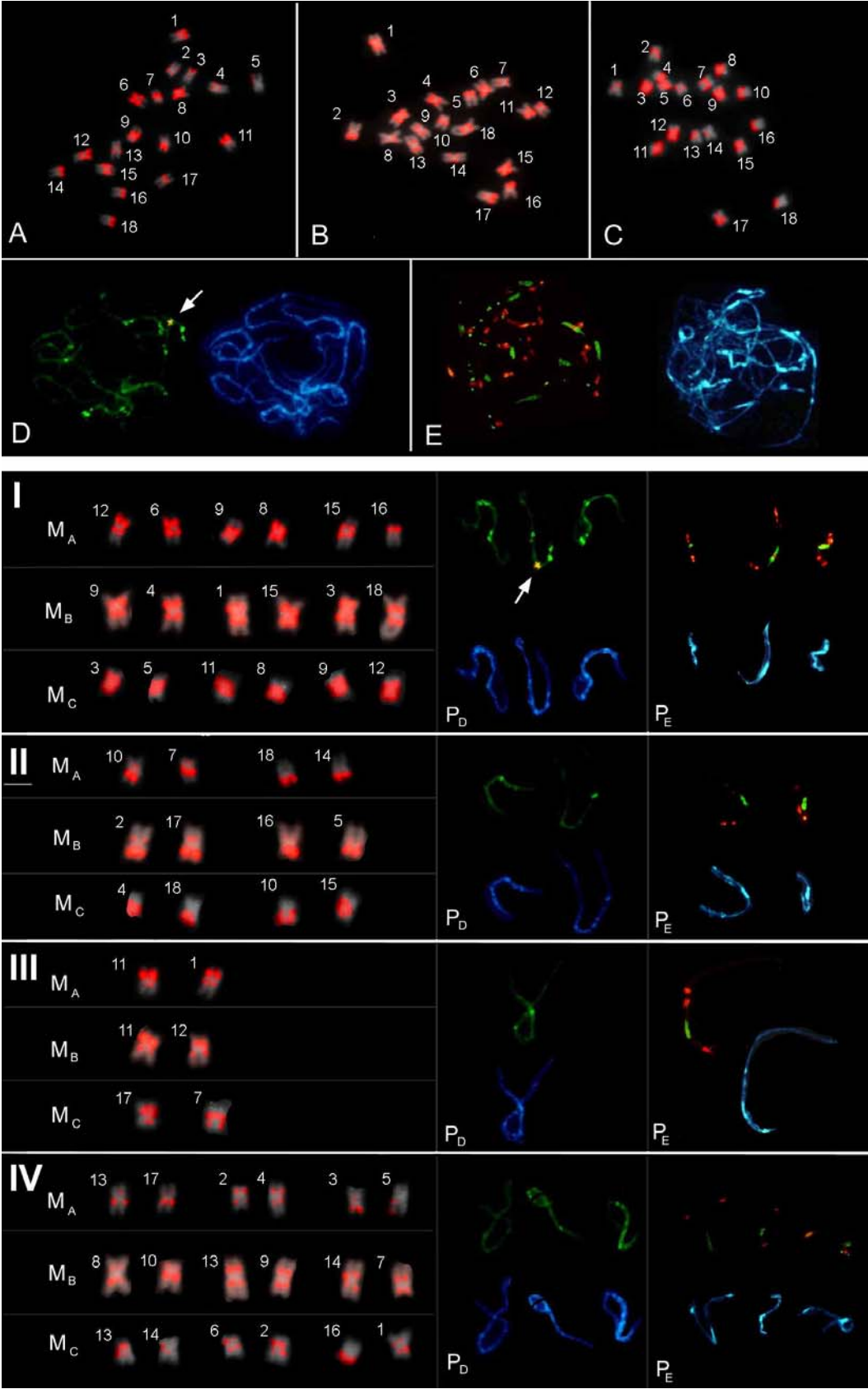


Abb.5

Multi-colour FISH und die Rehybridisierung (nicht dargestellt) der Präparate mit den rDNA-Genen zeigte, dass die Chromosomen, welche die ribosomalen Gene tragen (Chromosom 1 und 4), durch starke pEV1-Signale charakterisiert und der Gruppe I zuzuordnen waren. An den Pachytänchromosomen aus Abb. 5D wurde die 5S rDNA durch ein orange-rotes Hybridisierungssignal detektiert (DNA-Sonde: pXV1). Die Rehybridisierung der 18S-5,8S-25S rDNA (DNA-Sonde: pTA71) an Metaphasechromosomen ist in Abb. 6A (rechts, grüne Fluoreszenz) dargestellt.

Nach pEV1-*in situ* Hybridisierung und Einteilung in die oben beschriebenen Gruppen zeigte die Rehybridisierung mit der subtelomerischen Satellitensequenz pAV34 an den Armen des Chromosoms der Gruppe III stark unterschiedliche Signale (Abb. 6B III). Auf einem Chromosomenarm ist eine große Anzahl von subtelomerischen Repeats lokalisiert, während am anderen Chromosomenarm nur wenige Repeatkopien vorhanden sind. Weiterhin liessen sich die beiden Chromosomenpaare der Gruppe II durch die Signalintensität des subterminalen Satelliten differenzieren. Ein Chromosompaar zeigte auf beiden Chromosomenenden ein deutliches Signal auf beiden Chromatiden (Abb. 6B II Pfeil). Auf dem zweiten Chromosomenpaar der Gruppe II konnten nur an einem Chromosomenende subtelomerische Repeats detektiert werden (Abb. 6B II Pfeilkopf). Durch simultane *in situ*-Hybridisierung des interkalaren Satellitenrepeats pEV1 und des subtelomerischen Satelliten pAV34 ist demnach eine weitere Unterscheidung der zwei Chromosomenpaaren der Gruppen II möglich.

Weitere repetitive Sequenzen, die in unterschiedlicher Kopienzahl auf den Chromosomen lokalisiert sind, wie z.B. der *ApaI*- bzw. *RsaI*-Satellit pAN136, zeigten Hybridisierungsmuster, die auf eine Repeatverteilung ähnlich des pEV1-Satelliten schließen ließen. Auf 4-6 Chromosomen, die durch eine hohe Kopienanzahl des pEV1 gekennzeichnet waren, wurden relativ starke Hybridisierungssignale detektiert, während schwache Signale auf den übrigen, noch nicht eindeutig identifizierbaren Chromosomen nachgewiesen wurden. Eine Identifizierung weiterer Chromosomen war deshalb durch das Satellitenrepeat pAN136 nicht möglich (Abb. 6C).

Der centromernah lokalisierte *Bam*HI-Satellit pBV1 liegt ebenfalls in unterschiedlicher Amplifikation auf den Chromosomen vor. Vier Chromosomenpaare zeigen starke Hybridisierungssignale. Ein bis zwei Chromosomenpaare zeigen starke bis mittelstarke Signale, während 3-4 Paare durch schwache Signale charakterisiert sind (Abb. 5E grün; Abb. 6D grün). Nach Doppelhybridisierung des *Bam*HI- und des *Eco*RI-Satellitenrepeats an

Pachytänchromosomen wurde gezeigt, dass drei Chromosomenpaare mit starken Signalen der Gruppe I (Abb. 5I P_E) zuzuordnen sind. Zu den Chromosomen der Gruppe I gehört auch das Chromosomenpaar 1 und 4, die durch die chromosomale Lokalisierung ribosomalen DNA identifiziert wurden (Abb. 6C: 18S-5,8S-25SrRNA, grüne Fluoreszenz; Abb. 5I P_D: 5SrRNA, gelbe Fluoreszenz). Auf Chromosomen mit geringer Kopienzahl des *EcoRI*-Satelliten sind auch nur geringe Kopienzahlen des *Bam*HI-Satelliten durch schwache pericentromerische Hybridisierungssignale nachweisbar (Abb. 5E, grün).

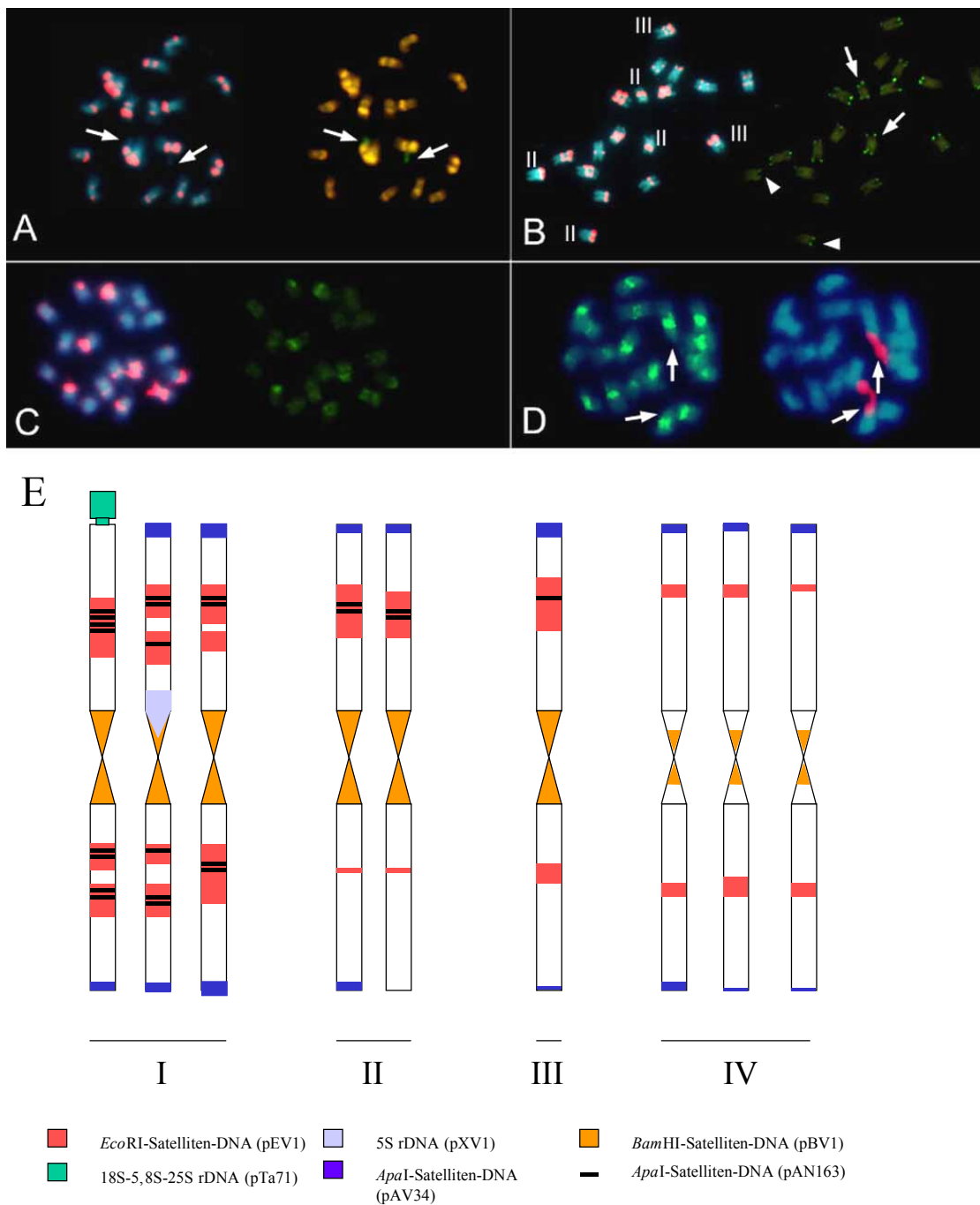


Abb. 6: Karyotypanalyse von *B. vulgaris* durch Kombination der Hybridisierungsmuster repetitiver Sequenzen:

(A-C) *Multi-colour* FISH des interkalaren *EcoRI*-Satellitenrepeats pEV1 (A-C links, rot). Simultane Hybridisierung einer DNA-Sonde für die 18S-5,8S-25S rDNA (pTA71) (A rechts Pfeile, grün), des subtelomerisch lokalisierten *ApaI*-Satelliten pAV34 (B rechts, grün) oder des interkalaren *ApaI*-Satelliten pAN136 (C rechts, grün).

In (B) wurden die Chromosomen der Gruppen II und III gekennzeichnet. Nach *in situ*-Hybridisierung des pAV34-Repeats sind die Chromosomen der Gruppe II unterscheidbar. pAV34-Satellitenrepeats konnten auf einem Chromosomenpaar an beiden Armen (Pfeile) und an dem anderen Chromosomenpaar nur an einem Chromosomenarm (Pfeilkopf) nachgewiesen werden (B rechts).

(D) FISH mit der *Bam*HI-Satelliten-DNA pBV1 (links, grün) und dem 18S-5,8S-25S rDNA-Sequenz pTA71 (rechts, rot, Pfeile) als Sonde.

(E) **Schematische Darstellung** der Loci der verschiedenen Repeats auf den 9 Chromosomen von *B. vulgaris*

Eine Zusammenstellung aller oben beschriebenen Ergebnisse zeigt die schematische Abbildung 6, in der die chromosomale Verteilung der untersuchten Repeats dargestellt wurde (Abb. 6E). Die drei Chromosomen aus Gruppe I sind durch starke pEV1-Signale auf beiden Chromosomenarmen gekennzeichnet und lassen sich durch die Loci der ribosomalen Gene unterscheiden. Beide Chromosomen aus Gruppe II zeigen eine stark asymmetrische pEV1-Repeatverteilung auf den Chromosomenarmen. Sie können durch Hybridisierung des subtelomerischen Satelliten pAV34 voneinander differenziert werden. An einem Chromosomenpaar aus Gruppe II sind in beiden terminalen Chromosomenbereichen pAV34-Repeats nachweisbar. An nur einem Chromosomenende lassen sich dagegen die pAV34-Repeats am zweiten Chromosom der Gruppe II detektieren. Das Chromosom aus Gruppe III ist nach *in situ*-Hybridisierung des pEV1 durch die deutliche und asymmetrisch angeordneten Signale auf den Chromosomenarmen erkennbar. Durch die Kombination der Hybridisierungsmuster in mitotischen und meiotischen Chromosomen lassen sich insgesamt sechs Chromosomenpaare differenzieren. Die drei weiteren bisher nicht unterscheidbaren Chromosomenpaare mit schwachen pEV1-Signalen wurden in einer Gruppe (IV) zusammengefaßt

3.2.2. Lokalisierung repetitiver Sequenzen auf Chromosomen der meiotischen Prophase I

Vergleichende Betrachtungen der Hybridisierungsmuster von pericentromerischen und interkalaren DNA-Sonden an mitotischen und meiotischen Chromosomen (Kap.3.2.1) demonstrierte das hohe Auflösungsvermögen der FISH an meiotischen Chromosomen. Pachytänchromosomen erlauben aufgrund ihres geringen Kondensationsgrades eine physikalische Kartierung eng benachbarter Sequenzen. Im Pachytän sind homologe Chromosomen vollständig gepaart, wodurch nach *in situ*-Hybridisierung nur die halbe Anzahl der im Genom vorhandenen Loci als Signal nachweisbar ist. Deshalb ist für die Quantifizierung der Hybridisierungssignale eine zweifelsfreie Abgrenzung des Pachytänstadium von vorangehenden und nachfolgenden Teilungsstadien zwingend notwendig. Weiterhin ist für die chromosomale Positionierung der DNA-Sonden die Lage und Ausrichtung der langgestreckten, sich oft überlagernden Prophase-I-Chromosomen im Nukleus notwendig. Durch Lokalisierung von pericentromerischen, interkalaren und telomerischen Chromosomenregionen im Zellkern wurde daher die komplexe Chromatinstruktur der ersten meiotischen Stadien, über die bisher wenig bekannt ist, untersucht.

Eine vollständige Paarung homologer Chromosomen im Pachytänstadium wurde durch Detektion der Gene der 5S rRNA bestätigt. Die 5S rDNA ist centromernah auf dem kurzen Arm des Chromosomenpaares 4 angeordnet (SCHMIDT *et al.*, 1994; SCHONDELMAIER *et al.*, 1997). Es war zu beobachten, dass im Gegensatz zum Zygotän- und frühen Pachytänstadien (Abb. 7A), in denen zwei benachbarte kleine Signale detektiert wurden, im Pachytänstadium nur ein starkes Hybridisierungsort nachgewiesen wurde (Abb. 7B). In der nachfolgenden Diakinese werden die centromernahen Abschnitte der Chromosomen getrennt und es wurden wiederum zwei Signale auf einem Bivalent detektiert (Abb. 7C).

Abb. 7: (A-C) Paarung homologer Chromosomen in der Prophase I: Die pericentromerische Region auf Chromosomenpaar 4 von *Beta vulgaris* wurden durch Detektion der 5S rRNA-Gene (rote Fluoreszenz) in frühen meiotischen Stadien lokalisiert. Die Assoziation im späten Zygotän (A), die Paarung im Pachytän (B) und die partielle Trennung der beiden homologen Chromosomen in der Diakinese (C) sind zu beobachten.

(D-G) Identifizierung der heterochromatischen Regionen im meiotischen Prophase-I-Nukleus: Doppelhybridisierung mit dem pericentromerischen *Bam*HI-Satellitenrepeat pBV1 (grün) und dem interkalar lokalisierten *Eco*RI-Satellitenrepeat pEV1 (rot) auf Chromosomen des Leptotäns (D), frühen Zygotäns (E), Pachytäns (F) und frühen Diplotäns (G). Nebeneinander dargestellt ist jeweils der Nukleus nach DAPI-Färbung, das Hybridisierungsmuster und eine Überlagerung von DAPI-Färbung und Fluoreszenzsignalen. (F, Pfeile) Stark DAPI-gefärbte Bereiche, die nicht durch die Satelliten-Sonden markiert wurden. (G, Pfeil) Ein zentral lokalisierter pBV1-Satellitenblock wird durch pEV1-Blöcke flankiert.

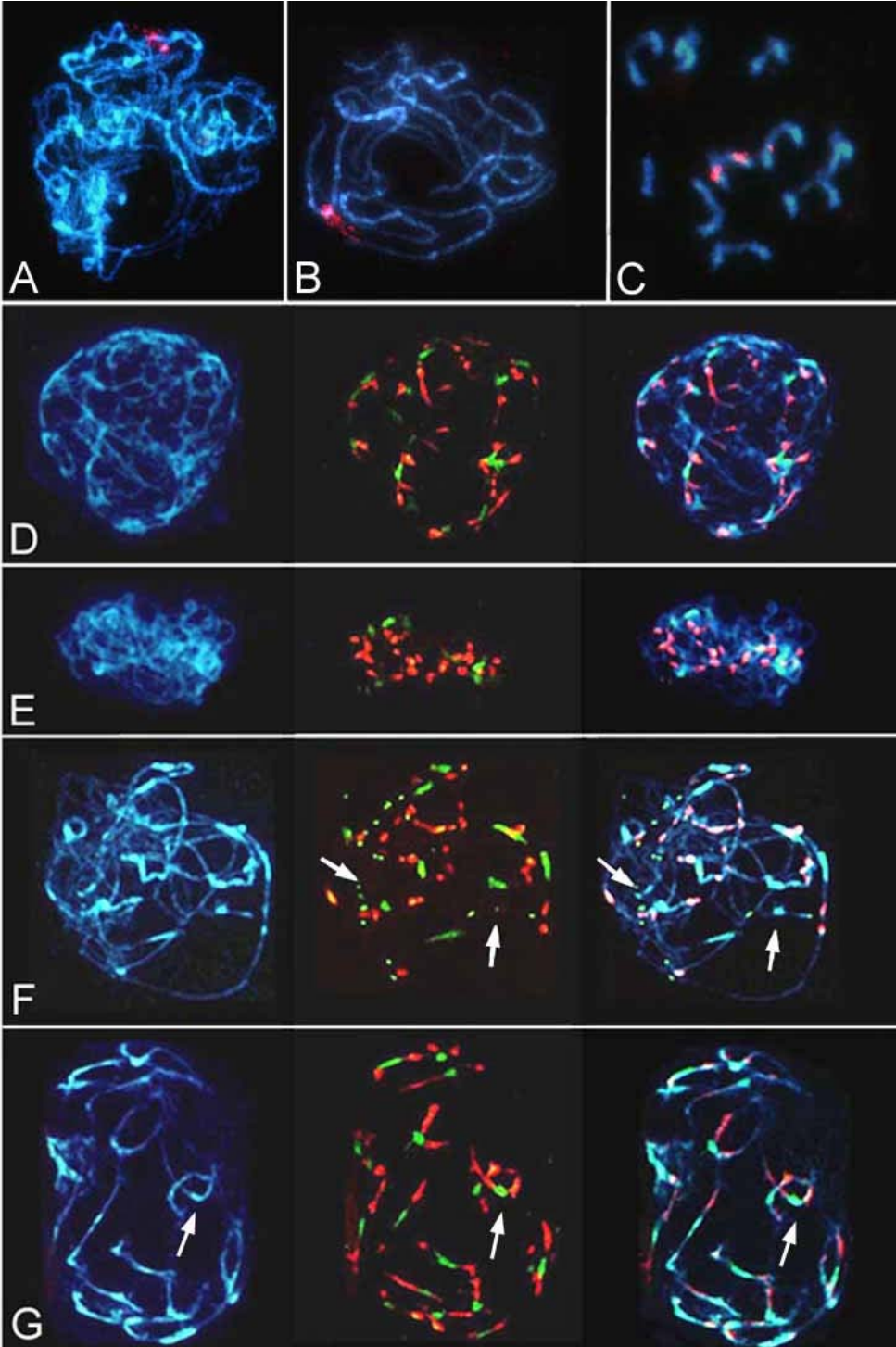


Abb. 7

Neben der centromernah lokalisierten 5S rDNA wurden Repeatblöcke zweier Satellitenfamilien im Prophase-I-Nukleus lokalisiert. Durch FISH mit DNA-Sonden des interkalaren *Eco*RI-Satellitenrepeats pEV1 und des centromernahen *Bam*HI-Satellitenrepeats pBV1 konnten nahezu alle stark DAPI-gefärbten Regionen markiert werden (Abb. 7D-G). In den relativ undifferenzierten Chromatinstrukturen des Leptotäns (Abb. 7D) waren längliche Signale erkennbar, die weniger kondensierte Abschnitte der DNA repräsentieren. In den folgenden Stadien war eine paarweise Anordnung der interkalaren und pericentromerischen Signale zu beobachten (nicht dargestellt). Die diskreteren Signale verdeutlichten eine zunehmende Kondensierung der Chromosomen. Im frühen Zygotän (Abb. 7E) gruppieren sich die Satellitenregionen zentral und eng gepackt in einem Chromatinknoten. Der Knoten lockerte sich im Pachytän (Abb. 7F) auf und die heterochromatischen Zentren verteilten sich wieder über den gesamten Nukleus. Die Organisation der interkalaren und pericentromerischen Satelliten auf einzelnen Bivalenten war zu erkennen. Zentrale Hybridisierungssignale der pBV1-Sonde wurden durch pEV1-Signale flankiert, wobei der Abstand der Satellitenblöcke voneinander unerwartet gering war. Die centromerische Region schien stärker kondensiert als die terminalen Chromosomenregionen.

Im Übergang zum Diplotänstadium (Abb. 7G) trennten sich die Bivalente und blieben nur über terminale Chromosomenabschnitte verbunden. In den nachfolgenden Stadien der Diakinese und Metaphase I lagen die Bivalente sehr stark kondensiert vor und eine simultane chromosomale Lokalisierung beider Satellitensequenzen führte zu nicht differenzierbaren Signalen (nicht dargestellt).

Ergänzend wurde in den Stadien der meiotischen Prophase I die Ausrichtung der Chromosomenenden untersucht. Nach Hybridisierung der Telomersonde pLT11 aus *A. thaliana* (RICHARDS & AUSUBEL, 1988) und der Sonde pTA71 für die terminal auf Chromosom 1 lokalisierte 18S-5,8S-25S rDNA (GERLACH & BEDROCK, 1979), die mit dem Nukleolus assoziiert ist, wurden die terminalen Chromosomenregionen in der Meiose lokalisiert. Im frühen Leptotän waren die Hybridisierungssignale über den gesamten Nukleus verteilt. Teils paarweise angeordnete Signale deuteten an, dass terminale Bereiche homologer Chromosomen eng nebeneinander lokalisiert waren (Abb. 8B). Eine Anhäufung der Hybridisierungsorte in diskreten Bereichen oder entlang der Kernmembran wurde nicht beobachtet. Aufgrund der vorliegenden Daten kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass eine Assoziation in distinkten Domänen entlang der Kernmembran erfolgte. Zu bedenken ist, dass die dreidimensionale Kernstruktur durch die Chromosomenpräparation zwangsläufig zerstört wurde und nur eine zweidimensionale Darstellung der Ergebnisse

möglich war. Die räumliche Anordnung der Chromosomenenden kann daher nicht eindeutig wiedergegeben werden.

Der Nukleolus mit der 18S-5,8S-25S rDNA ist zentral lokalisiert. Im Chromatinknoten des Zygotänstadiums wurden die Chromosomenenden und die 18S-5,8S-25S rDNA peripher und nur auf einer Seite detektiert. Dies deutet auf eine Polarisierung der Chromosomenenden im Zygotänstadium hin (Abb. 8B und C).

Durch die Ergebnisse der *in situ*-Hybridisierungen, die in Abb. 8C dargestellt sind, wurde erstmals nachgewiesen, dass die Arme des rDNA-tragenden Chromosom 1 durch Telomere abgeschlossen werden (Abb. 8B und C, Pfeile). In Studien an mitotischen Chromosomen konnten telomerischen Repeats terminal der ribosomalen rDNA bisher nicht lokalisiert werden. Nur das hohe Auflösungsvermögen der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung an meiotischen Chromosomen erlaubt, die eng benachbarten Sequenzen simultan zu detektieren. Im Leptotänstadium wurden Telomere und rDNA im peripheren Bereich des Nukleolus kolokalisiert. Im Zygotän ragen die rDNA-tragenden Chromosomenenden aus dem Chromatinknoten heraus. In terminaler Position wurden auf beiden Chromosomen die telomerischen Repeats eindeutig nachgewiesen, während proximal die rRNA-Gene durch zwei langegezogene starke Signale detektiert werden konnte. Dies zeigt eindeutig, dass telomerische Sequenzen distal der ribosomalen rDNA lokalisiert sind.

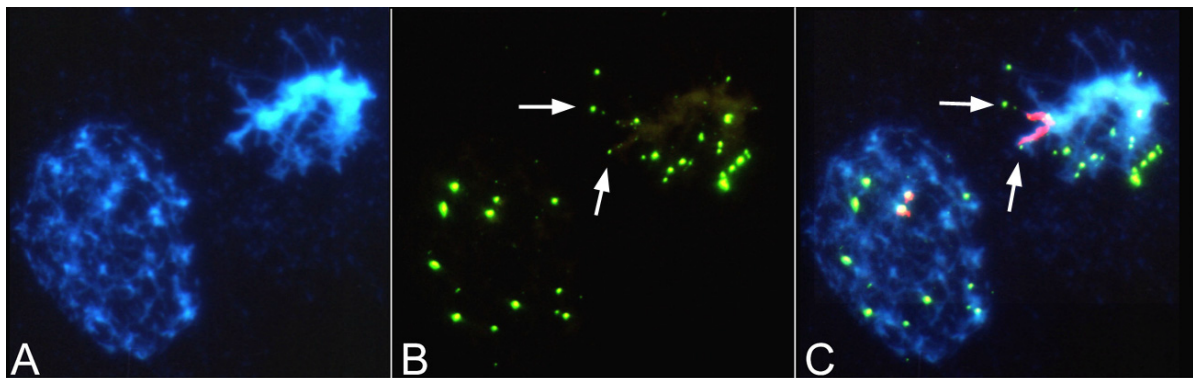


Abb. 8: Lokalisierung terminaler Chromosomenregionen während der frühen Meiose: Die terminalen Abschnitt der *B. vulgaris*-Chromosomen wurden mit der Telomer-Sonde pLT11 (grün) und der DNA-Sonde pTA71 (rot), welche die 18S-5,8S-25S rRNA-Gene detektiert, im Kern von *B. vulgaris* lokalisiert. DAPI-Färbung der PMC (A), Detektion der Digoxigenin-markierten Sonde pLT11 (B grün) und der Biotin-markierten 18S-5,8S-25S rRNA-Gene (C rot). Paarweise Verteilung der Signale im Leptotän (links unten). Ausrichtung der Chromosomenenden zu einer Seite im Zygotän (rechts oben).

Signale der Telomer-Sonde pLT11 sind terminal an den rDNA-tragenden Chromosomen zu erkennen (B + C, Pfeil).

Durch die ausführliche und genaue Betrachtung der ersten meiotischen Stadien mit komplexen Chromatinstrukturen (Leptotän, Zygotän mit Chromatinknoten, frühes Diplotän)

wurde das Verhalten, d.h. insbesondere die Assoziation und Paarung homologer *Beta*-Chromosomen aufgezeigt. Durch FISH mit centromerisch, interkalar und telomerisch lokalisierten DNA-Sequenzen wurde die Ausrichtung der Chromosomen im Nukleus der frühen meiotischen Stadien verdeutlicht.

Durch diese Studien wurde die Voraussetzung für eine bessere chromosomale Abgrenzung und Quantifizierungen von FISH-Signalen an Chromosomen der frühen meiotischen Stadien geschaffen. Frühe meiotische Chromosomenstadien sind durch ihre relativ dekondensierte DNA besonders für die Lokalisierung von eng benachbarten DNA-Sonden geeignet. Wichtige Grundlagen für die physikalische Feinkartierung der Chromosomen von *B. vulgaris* durch Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung konnten erarbeitet werden.

3.2.3. Physikalische Feinkartierung und Vermessung terminaler Chromosomenregionen durch *fib*-FISH

Für die physikalische Feinkartierung der Chromosomenenden in *B. vulgaris* wurde die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung an Chromatinfasern durchgeführt. Den äußeren Abschluss der Chromosomen bilden Wiederholungen stark konservierter Telomersequenzen mit der Konsensussequenz 5'-TTTAGGG-3' (RICHARDS & AUSUBEL, 1988; GANAL *et al.*, 1992; FUCHS *et al.*, 1995). Sie haben eine bedeutende Funktion bei dem Schutz und der Stabilisierung der Chromosomenenden. Die Länge der Telomere ist dynamisch und ist mit dem Alterungsprozess von Zellen korreliert (ZAIKAN, 1995). FISH-Analysen von Metaphasechromosomen von *B. vulgaris* zeigten an allen Chromosomenenden Signale unterschiedlicher Intensität, die durch variierende Kopienanzahl der Repeats erzeugt wurden (Abb. 9A). Um die Längen der telomerischen Repeatblöcke quantifizieren zu können, waren hochauflösende FISH-Verfahren an dekondensierten Chromatin notwendig. Nur eine hohe Auflösung des Nachweisverfahrens erlaubt eine Korrelation von Signal und Zielsequenzlänge.

Durch *in situ*-Hybridisierung an gestreckten Chromatinfasern konnte das Vorkommen von unterschiedlich langen Telomersequenzen bestätigt werden. Eine Abschätzung der Telomerlänge der Zuckerrübenchromosomen wurde durch Ermittlung der Längen von zusammenhängenden Signallinien durchgeführt. Die optische Vermessung erfolgte mit dem Programm „MicroMeasure 3.3“ (REEVES, 2001), das unter der Internet-Adresse <http://www.colostate.edu/Depts/Biology/MicroMeasure> abrufbar ist. Unter Annahme eines durchschnittlichen Streckungsfaktors der DNA von 3.27 kb/μm (FRANZ *et al.*, 1996a) wurden für die Längen der telomerischen Sequenzblöcke Werte zwischen ca. 35 kb und 170

kb ermittelt (Abb. 9C). Eine Clusterung der Werte und eine Verteilung der Telomerlängen in Gruppen war nicht zu beobachten.

Proximal zu den Telomersequenzen sind subtelomerischen Repeats lokalisiert. Der subtelomerische *ApaI*-Satellit pAV34 (JANSEN, 1999) wurde an den Enden der Chromosomenarme von *B. vulgaris* detektiert (Abb. 9B). Simultane *in situ*-Hybridisierungen der telomerischen (pLT11) und subtelomerischen (pAV34) DNA-Sequenzen an mitotischen und meiotischen Chromosomen zeigten eine Kolo-kalisation beider Repeatfamilien. Die Überlagerung der Signale der telomerischen und subtelomerischen DNA-Sonde erlaubten aber bisher keine Aussage über die exakte Anordnung und Größe der Repeats. Die Länge der subtelomerischen Repeatblöcke war bisher ebenfalls nichts bekannt. Daher wurden die hochauflösenden *fbre*-FISH Studien auf die Analyse der subtelomerischen Regionen ausgedehnt. Durch FISH an gestreckten Chromatinfasern wurde beobachtet, dass pAV34-Blöcke in unterschiedlichen Längen auftraten und proximal zu den Telomerbereichen lokalisiert waren. Der Übergang der Signale zwischen beiden Sequenzblöcken war variabel. Nach einer genaueren Auswertung von fünf Chromatinpräparationen und zwei zeitlich getrennt durchgeführten *in situ*-Hybridisierungen, ließen sich die beobachteten Signalverteilungen drei Organisationsformen zuordnen (Abb. 9D):

1. Es wurden telomerische und subtelomerische Signale beobachtet, die direkt aneinander grenzen. Eine Lücke ist zwischen ihnen nicht erkennbar.
2. Telomer und pAV34-Sequenzen sind in distinkten Bereichen lokalisiert, die durch eine Lücke unterbrochen werden.
3. Im Telomerbereich und im subtelomerischen Bereich treten jeweils einzelne Signalepunkte der anderen Sequenz auf (Interspersion). Zwischen beiden Regionen existiert ein Bereich ohne Hybridisierungssignal.

Daraus folgt, dass die subtelomerischen Repeats entweder durch nicht-homologe Sequenzen von den telomerischen Repeatblöcken getrennt sind oder beide Sequenzklassen direkt nebeneinander lokalisiert vorliegen. Repeatblöcke beider Klassen, die durch weitere DNA-Sequenzen getrennt sind, können durchmischt sein (Interspersion) oder distinkte Chromosomenabschnitte mit nur einer Sequenzklasse bilden. Da alle drei möglichen Organisationsprinzipien der telomerischen und subtelomerischen Sequenzen in den analysierten Chromatinpräparaten zu beobachten waren, scheinen die Chromosomenenden eines Genoms durch individuelle Sequenzanordnungen charakterisiert. Chromosomenspezifischen Strukturunterschiede der terminalen Regionen könnten für eine

korrekte Erkennung homologer Chromosomen in der Meiose verantwortlich sein. Denkbar wäre auch, dass der Aufbau der Chromosomentermi eine wichtige Funktion bei der Rekombination einnimmt.

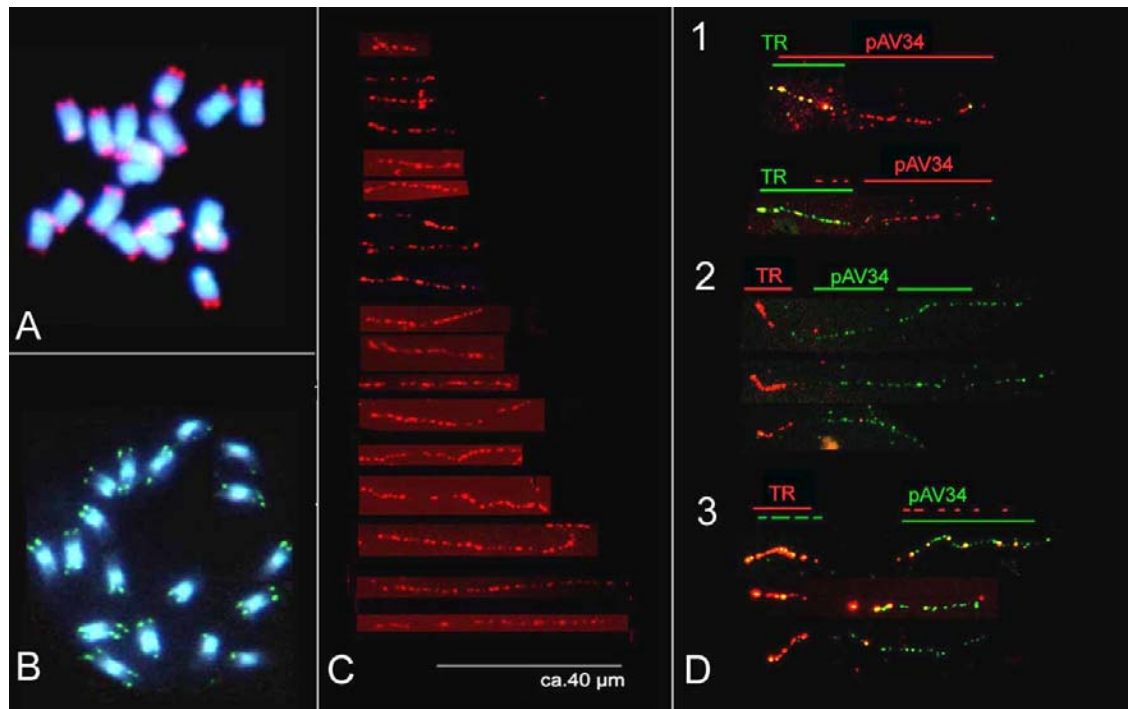


Abb. 9: Feinkartierung der terminalen Chromosomenregionen in *B. vulgaris*:

(A-B) FISH an Metaphasechromosomen von *B. vulgaris* mit der Telomersonde pLT11 (A) und dem subtelomerischen *ApaI*-Satelliten pAV34 (B).

(C-D) **Fibre-FISH an Chromatinfasern aus *B. vulgaris*:** Längenabschätzung der telomerischen Repeats (C rot) nach Hybridisierung mit der Telomersonde pLT11 auf 35 kb-170 kb. (D) **Multi-colour FISH** mit Telomersonde pLT11 (TR, rot) und subtelomerischem pAV34-Satelliten (grün). Zuordnung der Hybridisierungsmuster in drei mögliche Organisationsformen. **1:** Eng benachbart lokalisierte Sequenzklassen und partielle Interspesion; **2:** Distinkte chromosomale Bereiche beider Repeatblöcke, unterbrochen von nicht-homologen Sequenzen. **3:** Interspesion beider Sequenzklassen über den gesamten Hybridisierungsbereich. Repeatblöcke werden durch nicht-homologe Sequenzen getrennt.

3.3. Strukturelle Analyse von Wildrübenchromosomen aus der Sektion *Procumbentes*

Die genetische Basis der Zuckerrübe *B. vulgaris*, ist relativ eng. Wildrüben dagegen besitzen eine hohe genetische Variabilität und agronomisch interessante Eigenschaften. *B. patellaris*, *B. webbiana* und *B. procumbens*, die Wildrübenarten der Sektion *Procumbentes*, zeigen Resistenz gegen den Nematoden *Heterodera schachtii* Schm. Nach Artkreuzungen zwischen diesen Wildarten und *B. vulgaris* konnten nematodenresistente Zuckerrübenlinien selektiert werden.

Grundlage für die Untersuchung der Genome von züchterisch wertvollen nematodenresistenten Hybridlinien ist ein genaues Studien der Elterngenome. Ein Vergleich

der Chromosomenarchitektur in Eltern- und Hybridlinien wird nach chromosomaler Lokalisierung verschiedener repetitiver Sequenzklassen möglich. Eine veränderte Organisation von Sequenzen auf Chromosomen kann Rückschlüsse auf die Genomevolution und die Phylogenie einzelner Sequenzklassen innerhalb der Gattung *Beta* zulassen. Die chromosomale Lokalisierung repetitiver Sequenzklassen im Genom der Zuckerrübe wurde in vorangegangenen Kapiteln vorgestellt (Kap.3.2.1.). Vergleichende Untersuchung in zwei Wildrübenarten (*B. procumbens* und *B. patellaris*) der Sektion *Procumbentes* werden in den folgenden Kapitel beschrieben. Die chromosomale Lokalisierung von Repeats in Wildarten war Grundlage für die Analyse der nematodenresistenten Fragmentadditionslinien PRO1 und PAT2, die aus *B. procumbens* bzw. aus *B. patellaris* abstammende Chromosomenfragmente im Genom enthalten (Kap.3.4.).

3.3.1. Physikalische Kartierung von centromerassozierten und terminal lokalisierten repetitiven Sequenzen in *B. procumbens*

Eine wesentliche Komponente der repetitiven DNA-Fraktion von *B. procumbens* bilden die *Sau3A*-Satellitenfamilien pTS5 und pTS4.1. Molekulare Daten haben gezeigt, dass die *Sau3A*-Satelliten-DNA-Familien nur im Genom der drei *Procumbentes*-Arten vorhanden sind (SCHMIDT & HESLOP-HARRISON, 1996). Monomere dieser artspezifischen Satelliten konnten als DNA-Sonden genutzt und als molekulare Marker zur Selektion von nematodenresistenten Zuckerrübenhybriden eingesetzt werden (SCHMIDT *et al.*, 1990).

Durch Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung ließen sich die *Sau3A*-Satellitenrepeats im Wildrübengenom in pericentromerischen Chromosomenregionen lokalisieren (Abb. 10A+B) (siehe auch SCHMIDT & HESLOP-HARRISON, 1996). Die *Sau3A*-Satelliten besitzen unterschiedliche Amplifikationsgrade auf den Chromosomen. In *B. procumbens* lag die Anzahl der Chromosomen mit Blöcken des *Sau3A*-Satelliten pTS5 variabel zwischen 10 und 12 pro mitotischer Metaphase (Abb. 10A). Diese Chromosomen besitzen auch die *Sau3A*-Satellitensequenz pTS4.1. Der Satellit pTS4.1 ist auf vier weiteren Chromosomen nachweisbar und insgesamt auf 16 Chromosomen lokalisiert (Abb. 10B). Die simultane *in situ*-Hybridisierung beider Satellitensonden zeigte, dass pTS5 und pTS4.1-Repeats eng benachbart auf 10 bis 12 Chromosomen vorlagen. Durch die in Abb. 10A und B dargestellten Ergebnisse wurden die Untersuchungen an mitotischen Metaphasechromosomen von SCHMIDT & HESLOP-HARRISON (1996) bestätigt. Zur exakten Positionierung und Ermittlung der relativen Lage beider Satelliten zueinander wurden wenig kondensierte Pachytänchromosomen für die *in situ*-Hybridisierung eingesetzt. Durch die hohe Auflösung der Signale an den langgestreckten Bivalenten war erkennbar, dass die Centromere aus

mehreren Domänen bestanden. Die zentral lokalisierten pTS5-Satellitensequenzen wurden zu beiden Seiten durch Blöcke des pTS4.1-Satellitenrepeats flankiert. Die pTS5-Sonde erzeugte ein starkes zentrales Hybridisierungssignal, das von zwei schwächeren pTS4.1-Signalen flankiert wurde (Abb. 10C+D).

Weitere repetitive Sequenzfamilien des Genoms der Wildrübe *B. procumbens* werden durch Retroelemente gebildet. Der Klon pBP10 aus *B. procumbens* zeigte eine hohe Homologie (71% Homologie auf DNA-Ebene) zum Gen der Reversen Transkriptase der Ty3-gypsy-Retrotransposons (GINDULLIS *et al.*, 2001). Nach FISH mit pBP10 an Chromosomen mitotischer Metaphasen von *B. procumbens* wurden Hybridisierungssignale unterschiedlich hoher Intensität in zehn pericentromerischen Chromosomenregionen detektiert (Abb. 10G). Schwache Hybridisierungssignale auf allen Chromosomenarmen zeigten zusätzliche, dispers verteilte Kopien der Retroelemente in *B. procumbens* (Abb. 10G). Durch *in situ*-Hybridisierung an Pachytänchromosomen wurde das Ty3-gypsy-ähnliche Retroelement pBP10 in hoher Kopienzahl in den centromerischen Regionen von fünf Bivalenten nachgewiesen. Die Rehybridisierung der Chromosomen mit pTS5 ergab, dass Retroelemente und *Sau3A*-Satelliten auf allen fünf Chromosomenpaaren kolokalisieren (Abb. 10E+F). Auch auf den relativ dekondensierten Pachytänchromosomen konnten in den centromernahen Bereichen keine Domänen identifiziert werden, die ausschließlich *Sau3A*-Satelliten oder Ty3-gypsy-ähnliche Retroelemente enthalten.

Abb. 10: (A-J) Physikalische Kartierung von centromerassozierten und telomerischen repetitiven Sequenzen in der Wildrübe *B. procumbens*:

(A-B) Lokalisierung der centromernahen *Sau3A*-Satelliten pTS5 (A) und pTS4.1 (B) an mitotischen Chromosomen.

(C) Doppelhybridisierung des Satelliten pTS5 (rot) und pTS4.1 (grün) an Pachytänchromosomen. Mittig sind die Einzelhybridisierungen und rechts ist eine Überlagerung aller Signale dargestellt.

(D) Ausschnittsvergrößerung aus (C): Eine zentrale pTS5-Domäne (gelb) wird durch pTS4.1 Satellitenblöcke (grün) flankiert.

(E-F) Nachweis der Kolokalisation des Ty3-gypsy-Retroelements pBP10 (rot) mit dem *Sau3A*-Satelliten pTS5 (grün) in pericentromerischen Regionen der Pachytänchromosomen.

(F) Digitale Überlagerung der Hybridisierungsmuster. (G) Lokalisierung des Ty3-gypsy-Retroelements pBP10 auf mitotischen Chromosomen.

(H-I) Nachweis des subtelerischen *ApaI*-Satellitenrepeats pAV34 (H) und des telomerischen Repeat (I rot) auf den Wildrübenchromosomen.

(J) Lokalisierung des centromernahen und in geringer Kopienzahl vorliegenden *EcoRI*-Satelliten pEV1.

Die DAPI-gefärbten Chromosomen sind jeweils links in den Abbildungen dargestellt.

(K-M) Nachweis der centromerassoziierter Satelliten an mitotischen Chromosomen von *B. patellaris*: (K) DAPI-Färbung der *B. patellaris*-Chromosomen. (L) Lokalisierung der *Sau3A*-Satelliten pTS5 (rot) und pTS4.1 (grün) durch FISH. (M) Überlagerung beider Hybridisierungsmuster. Pfeile kennzeichnen die Chromosomen mit stärkeren pTS5-Signalen. (K Pfeil) Potentielle Chromosomen, von denen das Chromosomenfragment der Linie PAT2 abstammen könnte (siehe Kap. 6.4.3).

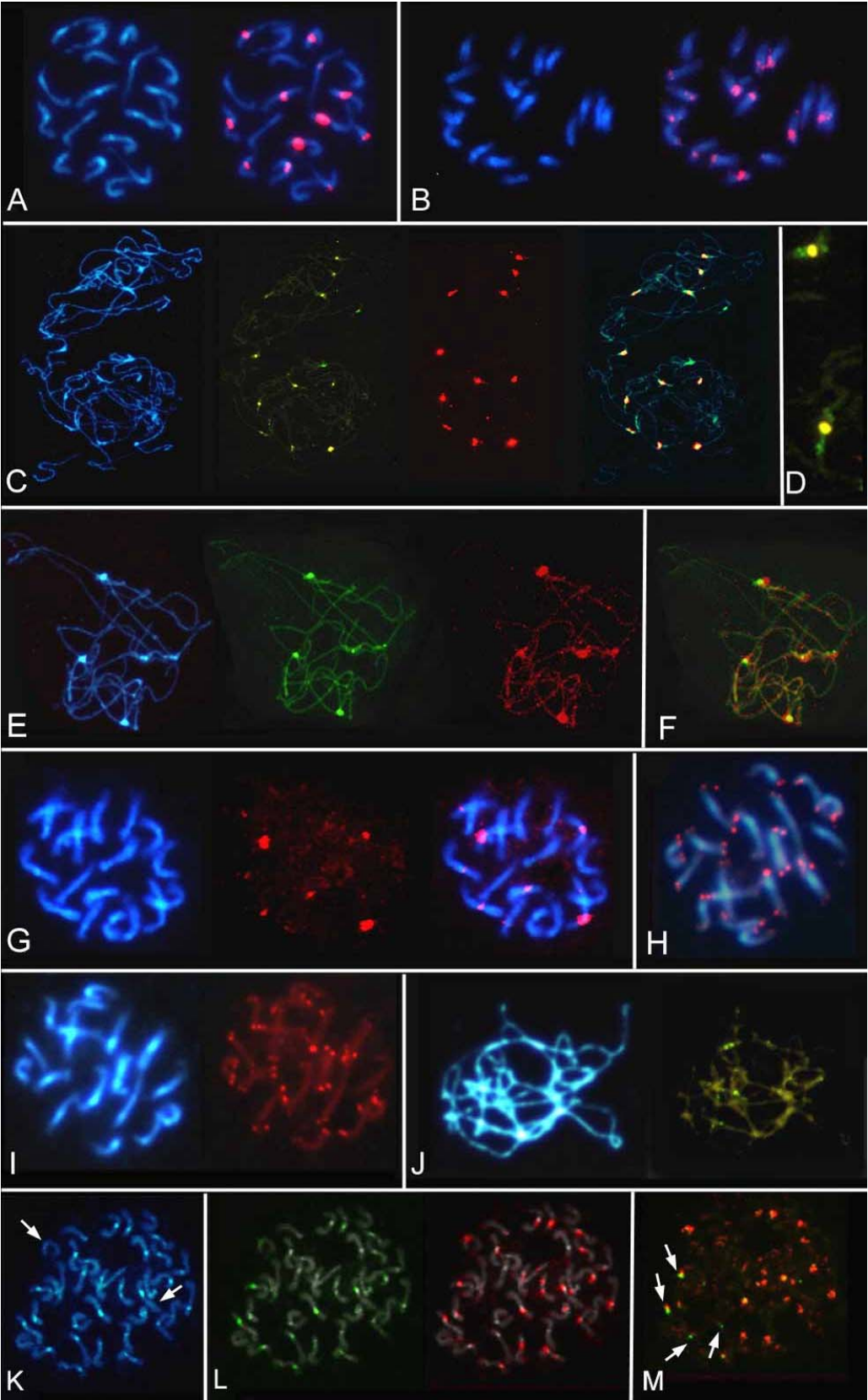


Abb. 10

Die chromosomale Lokalisierung der *Sau3A*-Satellitenrepeats pTS5 und pTS4.1 sowie des Ty3-*gypsy*-ähnlichen Retroelements pBP10 ermöglichten die Erstellung eines Modells der Centromerregion von *B. procumbens* (Abb. 11; GINDULLIS *et al.*, 2001). Eine zentrale pTS5-Repeats enthaltende Domäne wird von pTS4.1-Repeatblöcken flankiert. Unterbrochen werden die Satelliten durch kleinere Regionen mit DNA-Sequenzen, die komplexe Struktur aufweisen (z.B.: Ty3-*gypsy*-Retrotransposons). Dieses Modell war ein Ausgangspunkt für strukturelle Untersuchungen des Centromeres aus Minichromosomen der Fragmentadditionslinie PRO1.

Zusätzlich zu den Sequenzen der *Sau3A*-Satelliten und der Ty3-*gypsy*-ähnlichen Retroelemente pBP10 wurden Repeats des *EcoRI*-Satelliten auf *B. procumbens*-Chromosomen nachgewiesen. Der *EcoRI*-Satellit lag im Genom von *B. vulgaris* in den interkalaren Chromosomenregionen hochamplifiziert vor. An *B. procumbens*-Chromosomen dagegen waren schwache Hybridisierungssignale in centromernaher Region nach FISH mit *EcoRI*-Satellitenrepeats detektierbar (Abb. 10J). Die *Sau3A*-Satellitenblöcke werden demnach sowohl durch kleinere Blöcke des *EcoRI*-Satelliten als auch durch Ty3-*gypsy*-ähnlichen Retroelemente unterbrochen.



Abb. 11: Centromermodell von *B. procumbens*: pTS5-Repeats (rot) sind zentral lokalisiert und flankiert von pTS4.1-Regionen (grün). Überlappende Bereiche sind orange markiert. Unterbrochen werden die *Sau3A*-Satelliten durch kleine Blöcke des *EcoRI*-Satelliten (schwarz) und kleine Regionen komplexer DNA-Sequenzen (grau) z.B. Ty3-*gypsy*-ähnliche Retroelemente (verändert nach GINDULLIS *et al.*, 2001).

Um die Untersuchungen der Chromosomenarchitektur nicht nur auf den centromernahen Bereich zu beschränken, wurden die in *B. vulgaris* bereits eingesetzten telomerischen und subtelomerischen DNA-Sonden ebenfalls für *in situ*-Hybridisierungen an Chromosomen der Wildrübe *B. procumbens* verwendet. Eine genomspezifische chromosomale Organisation der beiden terminal lokalisierten Sequenzklassen, könnte z.B. für die Analyse terminaler Wildrüben-translokationen hilfreich sein.

Wie oben schon erwähnt, sind Telomere der Sequenz 5'-TTTAGGG-3' sind in zahlreichen Pflanzen vorhanden und durch FISH mit dem aus *A. thaliana* isolierten Klon pLT11 nachweisbar (RICHARDS & AUSUBEL, 1988). Weiterhin zeigten molekulare Daten zeigten, dass Sequenz des subtelomerische Repeats pAV34 in den Sektionen *Beta* und *Procumbentes* konserviert vorliegt (JANSEN, 1999). Dies wurde durch *in situ*-Hybridisierung der

telomerischen Sequenz pLT11 und der subtelomerischen *ApaI*-Satellitensequenz pAV34 an mitotischen Chromosomen von *B. procumbens* bestätigt (Abb. 10H+I). Wie auch in der Zuckerrübe *B. vulgaris* wurden beide Repeatfamilien in unterschiedlichen Amplifikationsgraden auf allen Chromosomenenden detektiert.

Die Organisation der Chromosomenenden scheint innerhalb der Gattung *Beta* konserviert. Die centromernahen Regionen der Wildrübe *B. procumbens* dagegen weisen genomspezifische Strukturen auf. Genomspezifisch vorkommende DNA-Sequenzen wie auch der Nachweis genomspezifischer chromosomaler Sequenzorganisationen könnten beispielsweise zur Untersuchung der Genomkonstitution in Hybridgenomen und zur Selektion von Hybridpflanzen eingesetzt werden.

3.3.2. Lokalisierung centromernaher Satelliten-DNA in *B. patellaris*

Da im Rahmen dieser Arbeit Hybridmaterial aus interspezifischen Kreuzungen von *B. procumbens* x *B. vulgaris* und *B. patellaris* x *B. vulgaris* untersucht werden sollten, wurde eine vergleichende Analyse der centromernahen Chromosomenregion im Genom von *B. procumbens* (Kap.3.3.1) und *B. patellaris* durchgeführt. Im Gegensatz zur 18-chromosomigen, diploiden Wildrübe *B. procumbens* aus der Sektion *Procumbentes* besitzt die nematodenresistente, tetraploide Wildrübe *B. patellaris* 36 Chromosomen. Die aus *B. procumbens* isolierten *Sau3A*-Satelliten pTS4.1 und pTS5 wurden in *B. patellaris* chromosomal lokalisiert (Abb. 10K-M) (siehe auch STEFFENSEN, 1997). Auf 22 Chromosomen konnten pTS5-Repeats detektiert werden. Auf 26 Chromosomen hybridisierte das pTS4.1-Repeat. FISH an meiotischen Pachytänchromosomen bestätigten 11 pTS5- und 13 pTS4.1-Repeatloci (nicht dargestellt).

In mitotischen Chromosomen wurde eine Kolokalisation beider *Sau3A*-Satelliten in 18-20 centromernahen Chromosomenregionen beobachtet. Auf weiteren 4-6 Chromosomen waren ausschließlich schwache pTS4.1-Hybridisierungssignale zu erkennen. Die Fluoreszenzintensität der durch pTS4.1 hervorgerufenen Signale war, verglichen mit den Signalintensitäten der pTS5-Repeats, meist stärker. Auf zwei in Abb. 10K gekennzeichneten Chromosomenpaaren (Abb. 10K Pfeile) waren die Signale der pTS5-Repeats stärker. Im Gegensatz dazu scheint auf den Chromosomen von *B. procumbens* das pTS5-Repeat gegenüber dem pTS4.1-Repeat in höheren Amplifikationsgraden vorzuliegen. Diese Beobachtung läßt eine unterschiedlich starke Amplifikation der Satellitenfamilien in den Genomen von *B. procumbens* und *B. patellaris* vermuten.

3.4. Anwendung der FISH in der Genomanalyse von Zuckerrübenhybriden

Durch Artkreuzungen zwischen Wildrüben der Sektion *Procumbentes* und der Zuckerrübe *B. vulgaris* wurden nematodenresistente Zuckerrübenlinien entwickelt, deren Genom Resistenzgen codierende Wildrüben-DNA-Sequenzen enthalten. Monosome Additionslinien ($2n = 18+1$), die ein zusätzliches Wildrübenchromosom besitzen, und Fragmentadditionslinien ($2n = 18+\text{Fragment}$), die nur ein Wildrübenfragment enthalten, wurden aus der Nachkommenschaft selektiert (JUNG & WRICKE, 1987; BRANDES *et al.*, 1987; JUNG *et al.*, 1992). Nach *crossing-over* Ereignissen und Übertragung von Wildrübenchromatin auf ein Zuckerrübenchromosom entstanden Translokationslinien ($2n = 18$) (SPECKMANN *et al.*, 1985; JUNG & WRICKE, 1987; LANGE *et al.*, 1990). Translokationslinien haben trotz der noch vorhandenen negativen Wildrübeneigenschaften für die Entwicklung von resistenten Zuckerrübensorten, die in der Landwirtschaft erfolgreich eingesetzt werden können, eine große Bedeutung.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung und Anwendung von molekularen cytogenetischen Verfahren zur Genomanalyse der nematodenresistenten Zuckerrübenlinien. Eine genaue cytogenetische Charakterisierung der Genome erlaubt Aussagen über die Entstehung, Herkunft, Stabilität und Vererbung von Chromosomen oder Chromosomenfragmenten und der auf ihnen lokalisierten agronomisch bedeutsamen Gene.

Die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung ermöglicht es, durch den Einsatz von artspezifischen Sonden die Wildrüben-DNA im Genom der Zuckerrübe zu markieren und zu identifizieren. Zur Untersuchung von Hybridgenomen können als artspezifische Sonden sowohl klonierte und charakterisierte DNA-Sequenzen als auch die genomische DNA der Elternarten (Genomische-*in situ*-Hybridisierung) eingesetzt werden.

Die Lokalisierung von Wildrübenchromatin, die Analyse der chromosomalen Zusammensetzung der Hybridgenome und die Charakterisierung von resistenten Pflanzenmaterial durch Genomische-*in situ*-Hybridisierung (GISH) und durch Hybridisierung von genomspezifischen Satellitensequenzen wird in den folgenden Kapiteln beschrieben.

3.4.1. Identifizierung von Wildrübenchromatin und Charakterisierung der Hybridlinien durch Genomische-*in situ*-Hybridisierung

Genomische-*in situ*-Hybridisierung (GISH) ist eine Variante der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung, bei der die gesamte genomische DNA markiert und als Sonde eingesetzt wird. Sie eignet sich zur Identifizierung parental Genome in Arthybriden und einzelner Chromosomen in Hybridpflanzen (SCHWARZACHER *et al.*, 1992). Voraussetzung für eine

erfolgreiche GISH ist eine ausreichende phylogenetische Distanz zwischen den Genomen der Elternarten, d.h. es muss ein hoher Anteil an artspezifischen Sequenzen in den parental Genomen vorhanden sein.

Eine Vorbehandlung (mechanische Fragmentierung) der als Sonde eingesetzten Gesamt-DNA erwies sich als vorteilhaft. Für eine optimale Hybridisierung wurde die genomische DNA durch Ultraschallbehandlung in Bruchstücke von 100-500 bp gespalten. In der Gattung *Beta* wurde die GISH zunächst an monosomen Additionslinien der Zuckerrübe etabliert und hinsichtlich der Sondenkonzentration optimiert. Ein optimales Signal-Hintergrund-Verhältnis wurde bei einer Sondenkonzentration von 100-150 ng in 30 µl Hybridisierungslösung erreicht.

In nematodenresistenten, monosomen Additionslinien ($2n = 18+1$), die ein zusätzliches Chromosom der Wildrübe *B. procumbens* enthalten, konnte das Wildrübenchromosom durch GISH eindeutig identifiziert werden. Verifiziert wurde dieses Ergebnis durch simultane Hybridisierung mit dem *B. vulgaris*-spezifischen Satelliten pBV1. Dieser Satellit markiert alle 18 Zuckerrübenchromosomen, zeigt jedoch keine Hybridisierung auf dem mit *B. procumbens*-DNA identifizierten Wildrübenchromosom (Abb. 12A).

Nach Hybridisierung differenziell markierter genomischer DNA aus *B. vulgaris* und *B. procumbens* und Detektion mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern wurden alle Zuckerrübenchromosomen mit roter und das Wildrübenchromosom mit grüner Fluoreszenz markiert (Abb. 12B+C). Eine besonders starke Fluoreszenz der centromerischen Chromosomenbereiche wurde durch hochrepetitive pericentromerische Satellitensequenzen (z.B. pBV1) verursacht. Wie aus Reassoziationskinetiken hervorgeht, assoziieren hochrepetitive Sequenzen schneller und daher effektiver an eine passende Zielsequenz als unikale DNA (HEMLEBEN, 1990). An phylogenetisch stark konservierte funktionelle DNA-Sequenzen, wie die rRNA-Gene oder die Telomersequenzen, binden beide Genomsonden. Signale, die durch Kreuzhybridisierung mit den terminal lokalisierten 18S-5,8S-25S rRNA-Genen verursacht wurden, konnten von wildrübenspezifischen Signalen eindeutig differenziert werden, da nach Überlagerung beider Hybridisierungsmuster die kreuzhybridisierenden Chromosomenbereiche orange erschienen. Auch morphologisch ist eine klare Unterscheidung zwischen einem vollständigem Chromosom und den rDNA-tragenden terminalen Chromosomenenden möglich. Durch Rehybridisierung mit rRNA-Sonden wurde die terminale Position der 18S-5,8S-25S rRNA-Gene auf einem Chromosomenpaar bestätigt (nicht gezeigt). Der Einsatz von Blockierungs-DNA zur Unterdrückung von Kreuzhybridisierungsreaktionen zwischen konservierten Sequenzen war

für die eindeutige Erkennung der Eltern Genome nicht notwendig. Dies zeigt, dass die phylogenetische Distanz der Eltern Genome aus den Sektionen *Beta* und *Procumbentes* ausreichend groß und eine Analyse durch GISH möglich ist.

Auch in Interphasekernen wurde das dekondensierte Wildrübenchromosom durch GISH nachgewiesen. Im Zuckerrübenhintergrund, der durch rote Fluoreszenz markiert war, zeigte das Wildrübenchromosom ein grünes Fluoreszenzsignal. Die im Nukleolus lokalisierte rDNA konnte durch orange gefärbte Bereiche identifiziert werden (Abb. 12C).

Erkenntnisse über die Chromosomenverteilung und das Verhalten des Wildrübenchromosoms während der Gametenentwicklung lassen sich durch GISH an verschiedenen meiotischen Teilungsstadien der monosomen Additionslinie gewinnen. Rekombinationsereignisse zwischen Wildrüben- und Zuckerrübenchromosomen lassen sich möglicherweise durch GISH-Untersuchungen analysieren. Weiterhin können Studien der Chromosomenverteilung in der Meiose auf das Verhalten von integrierter Wildrüben-DNA während der Reduktionsteilung hinweisen. Rückschlüsse auf die Transmission von agronomisch wichtigen Wildrüben Genen im Genom von *B. vulgaris* können erhalten werden.

Abb. 12: Nachweis von Wildrüben-DNA in nematodenresistenten Hybridlinien von *B. vulgaris* durch *in situ*-Hybridisierung mit genomischer DNA (GISH):

Pfeile weisen auf Wildrüben-DNA. **Pfeilköpfe** zeigen auf Kreuzhybridisierung mit 18S-5,8S-25S rDNA. Zur Erkennung der Chromosomenmorphologie wurden jeweils die DAPI-gefärbten Chromosomen (**blau**, links bzw. in (I) unten) abgebildet.

(**A-J**) Detektion von *B. procumbens*-Chromatin (grün).

(**A-E**) Identifizierung des Wildrübenchromosoms in der monosomen Additionslinie. Hybridisierung des *B. vulgaris*-spezifischen Satelliten pBV1 (**A rot**) bzw. Gesamt-DNA von *B. vulgaris* (**B-C rot**) zur Markierung der Zuckerrübenchromosomen. Nachweis des Wildrübenchromosoms in meiotischen Stadien: Pachytän (**D**) und Diakinese (**E**).

(**F**) Identifizierung eines Wildrübenfragments in der Fragmentadditionslinie PRO1.

(**G-J**) Detektion der Wildrübentranslokation in der Zuckerrübenlinie A906001. (**H-J**) Lokalisierung der Translokation in frühen meiotischen Stadien durch *multi-colour* FISH mit Gesamt-DNA von *B. vulgaris* (rot) im Zygotän (**H-I**) und Pachytän (**J**). In (**I**) ist die in (H) lokalisierte terminale Chromosomenregion mit der Translokation vergrößert dargestellt. Der Abschluß des Chromosomes wird durch Sequenzen gebildet, die in beiden Genomen vorkommen (telomerische oder subtelomerische Repeats, z.B.: pAV34).

(**K-L**) Analyse der Genomzusammensetzung von *B. vulgaris* x *B. corolliflora* Hybridlinien. Gesamt-DNA von *B. vulgaris* (grün) hybridisierte nur gering mit dem Wildrübenchromosom der monosome Additionslinie ($2n = 18+1$) (**K**). *Multi-colour* FISH mit Gesamt-DNA von *B. vulgaris* (rot) und *B. corolliflora* (gün-orange) an Chromosomen der amphitripleide Linie ($2n = 18+9$) (**L**).

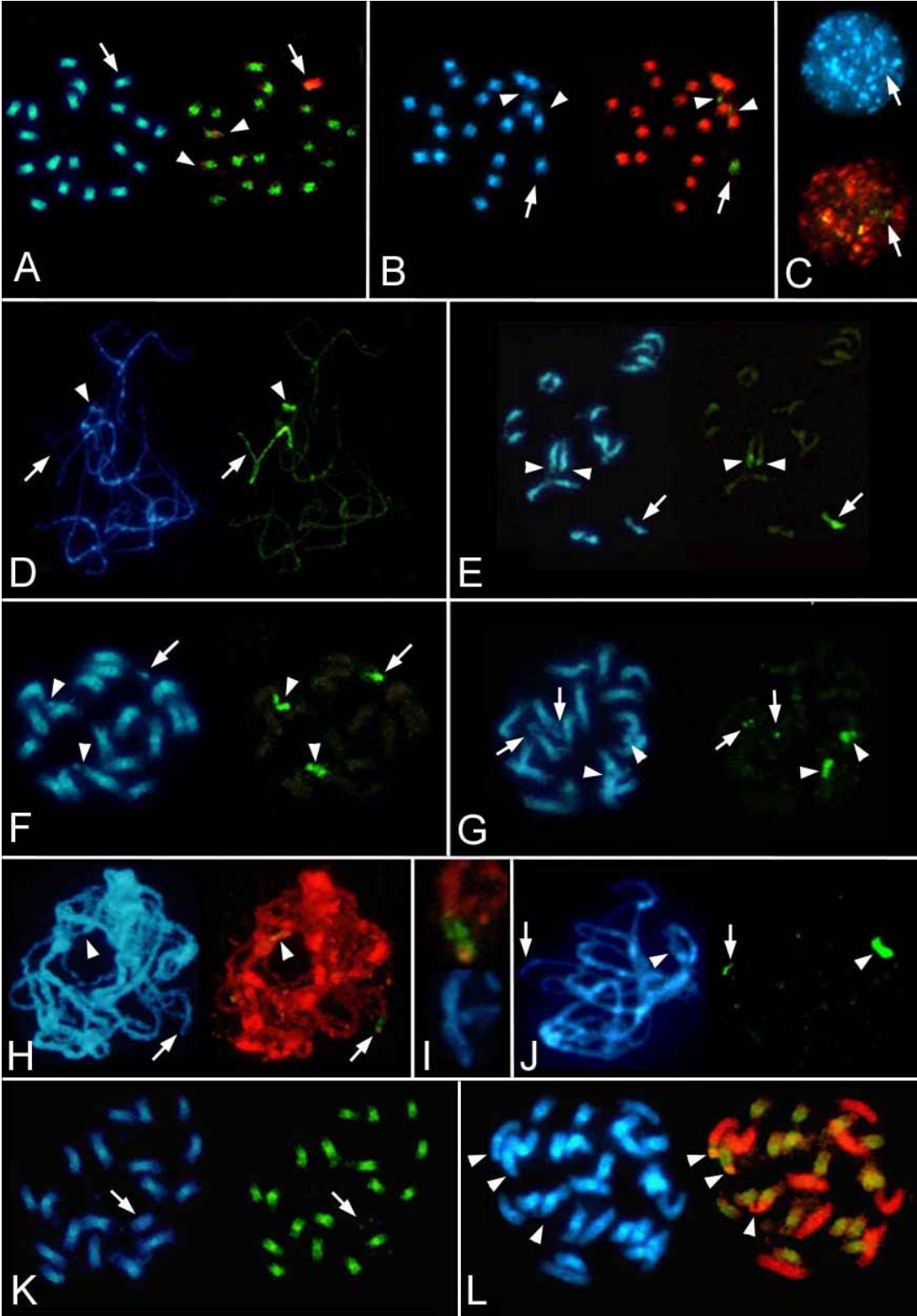


Abb. 12

Im Pachytänstadium wurde durch Hybridisierung genomischer DNA von *B. procumbens* ein Chromosom in seiner ganzen Länge markiert und als Wildrübenchromosom identifiziert. Eine separate Lokalisierung oder partielle Anlagerung an ein anderes Bivalent konnte nicht beobachtet werden (Abb. 12D). In der Diakinese wurde das Univalent durch starke Hybridisierungssignale als *B. procumbens*-Chromosom identifiziert (Abb. 12E). Eine Paarung des Wildrübenchromosoms mit den *B. vulgaris*-Chromosomen zu Bivalenten oder Trivalenten wurde nicht beobachtet. Die Ursache für die Bildung von Univalenten ist in der geringen Homologie zwischen den Chromosomen der Sektionen *Beta* und *Procumbentes* zu suchen. Eine Rekombination zwischen Zuckerrübenchromosom und dem Wildrübenchromosom ist deshalb ein seltenes Ereignis. In der ersten meiotischen Teilung (Aufteilung der homologen Chromosomen) wird das Wildrübenchromosom nur an einen Tochterkern weitergegeben. Theoretisch enthalten mindestens 50% der Gameten deshalb keine Wildrüben-DNA und sind nematodenanfällig.

Um die Einsatzmöglichkeiten der GISH nicht nur auf den Nachweis ganzer Chromosomen zu beschränken, wurde das Verfahren für die Detektion von Chromosomenfragmenten und einer relativ kleinen Translokation der Linie A906001 angewendet.

In mitotischen Metaphasestadien der Fragmentadditionslinie PRO1 wurde das resistenzvermittelnde Chromosomenfragment von *B. procumbens*, das eine Größe von 6-9 Mbp, besitzt durch GISH nachgewiesen (Abb. 12F). Die Größe des Fragments wurde unter der Annahme einer durchschnittlichen Chromosomengröße von 80 Mbp, durch Relation der Gesamtlänge eines Pachytänchromosomes zur Länge des Fragments geschätzt. Da die Genomische-*in situ*-Hybridisierung wiederum ohne Blockierungs-DNA durchgeführt wurde, traten terminal auf einem *B. vulgaris*-Chromosomenpaar Signale auf, die durch Kreuzhybridisierung der 18S-5,8S-25S rRNA-Gene verursacht wurden. Der Nachweis des Wildrübenchromatins in der homozygoten Translokationslinie A906001 durch GISH ist eine relativ schwierige Aufgabe, da die Wildrübenintrogression auf weniger als 1 Mbp geschätzt wird (KLEINE *et al.*, 1995). Im Gegensatz dazu enthält ein Rübenchromosom ungefähr 80 Mbp DNA ($2n = 2x = 18$; $1C = 758$ Mbp). Voraussetzung für einen erfolgreichen Nachweis waren qualitativ hochwertige, d.h. cytoplasmafreie Chromosomenpräparate.

In mitotischen Metaphasechromosomen wurde die Translokation terminal auf beiden homologen Chromosomen durch Hybridisierung von Gesamt-DNA aus *B. procumbens* lokalisiert (Abb. 12G). Die Detektion der Translokation in Stadien der meiotischen Prophase gelang ebenfalls. Simultane Hybridisierung von differentiell markierter genomischer DNA beider Elternarten führte zu einer roten Fluoreszenz der Zuckerrübenchromosomen und zu

grünen Signalen, die die Positionen des Wildrübenchromatins angeben. Im Zygotän und Pachytän war ein terminales wildrübenspezifisches Signal zu erkennen (Abb. 12H-J). Die detaillierte Betrachtung des physikalischen Endes des Translokationschromosoms zeigte im Zygotänstadium bei stärkerer Vergrößerung, dass die *B. procumbens*-Translokation einen orange markierten Bereich aufwies (Abb. 12I). Dies zeigt, dass kreuzhybridisierende DNA-Sequenzen, die in beiden Elternarten vorhanden sind, am terminalen Ende der Translokation lokalisiert sein müssen (Abb. 12I). Der in *B. vulgaris* und *B. procumbens* konservierte subtelomerische Satellit pAV34 (JANSEN, 1999) kann als Erklärung für die Kreuzhybridisierung am distalen Chromosomenende herangezogen werden. Nicht ausgeschlossen ist, dass das für fast alle Pflanzen charakteristische Telomersequenzenmotiv 5'-TTTAGGG-3' für die Kreuzhybridisierung verantwortlich ist.

Die aufgeführten Resultate zeigten, dass die Methode der Genomischen-*in situ*-Hybridisierung unter entsprechenden Voraussetzungen (Präparatequalität, Chromosomenspreitung, Auswahl geeigneter Stadien der Meiose oder Mitose, effektive Sondenmarkierung und -konzentration) ein Auflösungsvermögen erzielt, durch das Chromosomenabschnitte von 1000 kb identifiziert werden können.

In weiterführenden Arbeiten wurde das Verfahren zur Analyse von Hybridpflanzen, die nach Artkreuzung von *B. vulgaris* mit *B. corolliflora* selektiert wurden, eingesetzt (JANSEN, 1999). Die Wildarten der Sektion *Corollinae* sind u.a. aufgrund ihrer Toleranz gegenüber niedrigen Temperaturen und hohen Salzkonzentrationen, sowie durch Resistenzen gegen verschiedene Viren und Pilze sehr interessant für die Züchtungsforschung.

Monosome Additionslinien ($2n = 18+1$) von *B. vulgaris*, die ein zusätzliches Chromosom der Wildrübe *B. corolliflora* enthalten (Abb. 12K), sowie amphitriploide Linien ($2n = 18+9$), die 18 Zuckerrübenchromosomen und einen haploiden Chromosomensatz von *B. corolliflora* im Genom vereinen (Abb. 12L), wurden durch GISH untersucht. In der monosomen Additionslinie wurden 18 Chromosomen durch genomische DNA von *B. vulgaris* markiert (grüne Fluoreszenz), während ein Chromosom keine Hybridisierungssignale zeigte (Abb. 12K). In der amphitriploiden Linie wurden neun Chromosomen, die morphologisch nicht von Zuckerrübenchromosomen differenziert werden können, durch Gesamt-DNA von *B. corolliflora* identifiziert (Abb. 12L orange-rot). Die 18 Zuckerrübenchromosomen konnten durch differentiell markierte Gesamt-DNA von *B. vulgaris* simultan detektiert werden (Abb. 12L grün-gelb). Daraus folgt, daß durch Hybridisierung der parentalen Gesamt-DNA aus *B. vulgaris* und *B. corolliflora* die Chromosomen spezifisch markiert wurden und die Genomzusammensetzung in beiden Hybridlinien eindeutig bestimmt werden konnte.

Verifiziert wurde die genomspezifische Hybridisierung wiederum durch *multi-colour* FISH mit dem *B. vulgaris*-spezifisch hybridisierenden *Bam*HI Satellitenrepeat pBV1 (nicht dargestellt). Trotz des relativ geringen phylogenetischen Abstandes zwischen den Sektionen *Beta* und *Corollinae* (FRITSCHÉ *et al.*, 1987) war ein zusätzlicher Einsatz von Blockierungs-DNA nicht notwendig; d.h. es existiert eine ausreichend genetische und strukturelle Distanz zwischen den Genomen der Elternarten *B. vulgaris* und *B. corolliflora*.

3.4.2. Identifizierung von Wildrübenchromatin in nematodenresistenten

Zuckerrübenlinien durch genomspezifische DNA-Sequenzen

Phylogenetisch relativ junge Sequenzfamilien, die nur in Arten der Sektion *Beta* oder *Procumbentes* existieren, können sehr effektiv für die Genomanalyse von Arthybriden eingesetzt werden. Nach vergleichender Analyse der Genomorganisation durch *Southern*-Hybridisierung wurden tandemartig angeordnete Satelliten-DNA-Sequenzen der Gattung *Beta* charakterisiert, die für die Sektionen *Beta* oder *Procumbentes* spezifisch sind (SCHMIDT & HESLOP-HARRISON, 1996). Als DNA-Sonden für eine FISH eingesetzt, eignet sich diese Satelliten-DNA zur Markierung von Wildrübenchromatin und zu genomdiagnostischen Zwecken (d.h. zur Analyse der Genomzusammensetzung von Arthybriden, wie monosome Additionslinien und Fragmentadditionslinien).

3.4.2.1. Physikalische Feinkartierung des monosomen Chromosomenfragments in der Fragmentadditionslinie PRO1

In der Nachkommenschaft interspezifischer Kreuzungen wurden verschiedene nematodenresistente Additionslinien selektiert, die nur Bruchstücke oder Fragmente eines Wildrübenchromosoms enthalten (SAVITSKY, 1975; JUNG & WRICKE, 1987; BRANDES 1992). Die nematodenresistente Fragmentadditionslinie PRO1 enthält ein Chromosomenfragment aus dem Genom von *B. procumbens*, auf dem ein Nematodenresistenzgen lokalisiert ist. Diese Linien sind wertvolles Basismaterial für die Züchtung resistenter Rübenlinien. Sie stellen ebenfalls ein hervorragendes experimentelles System zur Analyse artspezifischer DNA-Sequenzen dar, da ein Chromosomenfragment geringer Größe (6-9 Mbp) als Minichromosom im heterologen genetischen Hintergrund von *B. vulgaris* vorliegt. Daher ist es möglich, den chromosomalen Aufbau des Fragments isoliert zu analysieren.

Durch *in situ*-Hybridisierung mit den genomspezifischen *Sau*3A-Satelliten pTS4.1 und pTS5 aus *B. procumbens* war eine Identifizierung und Lokalisierung des Fragments im Genom der Fragmentadditionslinie möglich. In mitotischen Metaphasechromosomen der Fragmentadditionslinie PRO1 wurden beide Satelliten, die auf den Wildrübenchromosomen

centromerisch lokalisiert vorliegen, jeweils an einem Ende des schwach DAPI-gefärbten Fragments nachgewiesen (Abb. 13A+B). Der Vergleich mit den FISH-Ergebnissen an Wildrübenchromosomen weist demnach auf eine akrozentrische Fragmentstruktur. Die exakte chromosomale Positionierung der Satelliten wurde durch Hybridisierung an Pachytänchromosomen durchgeführt. Hybridisierungssignale von pTS5 wurden proximal und von pTS4.1 distal auf dem Fragment detektiert. Im Gegensatz zur Anordnung in *B. procumbens* flankierten pTS4.1-Satellitenrepeat den pTS5-Satellitenblock nur auf der distalen Seite. Die durch die Überlagerung beider Signale erzeugte gelbe Fluoreszenz wies auf eine teilweise Interspersion von pTS4.1 und pTS5 in der Grenzregion beider Satellitenarrays hin (Abb. 13C+D).

Die Hybridisierung an gestreckten Chromatinfasern ermöglichte eine wesentlich genauere Zuordnung beider Satelliten zueinander und eine Abschätzung der Größe der Repeatblöcke. Die aufeinanderfolgenden Signale der differentiell markierten pTS5- und pTS4.1-Sonden bestätigten, dass der Satellit pTS5 nur an einer Seite von pTS4.1-Sequenzen flankiert wird (Abb. 13E). Beide Satellitenarrays werden nicht durch größere Bereiche von nicht-homologen Sequenzen voneinander getrennt. Durch die vorhergehende Untersuchung von intakten Chromosomen war die relative Lage der Satellitenblöcke und ihre Orientierung bekannt. In vollständiger centromerischer Regionen werden zentral lokalisierte pTS5-Repeatblöcke auf beiden Seiten von pTS4.1 Repeats flankiert. Die Organisation der Satelliten auf dem Fragment läßt daher Rückschlüsse auf die Fragmententstehung zu. Ein Bruch innerhalb der centromerischen Chromosomenregion könnte zum Verlust der zweiten flankierenden pTS4.1-Repeatblöcke geführt haben.

Erste Vermessungen zeigten, dass der pTS5-Satellit in Sequenzblöcke von ungefähr 215 kb angeordnet ist. Die beobachteten Lücken in den pTS5-Arrays zeigten eine gelbe Fluoreszenz und enthielten vereinzelte Kopien des Satelliten pTS4.1. Die angrenzende, distale Region von ca. 117-123 kb bestand überwiegend aus pTS4.1-Sequenzen. Dieser Bereich war relativ homogen.

Wiederholungsuntersuchungen mit frisch präparierten Kernmaterial aus sehr jungen Blättern ergaben erhöhte Daten: Der pTS5-Satellit wurde über eine Länge von 243 ± 61 kb (Mittelwert \pm Standardabweichung, $n = 18$; $L_{\max} = 342$ kb) detektiert. Hybridisierungssignale der pTS4.1-Sonde wurden in einem Bereich von 263 ± 112 kb (Mittelwert \pm Standardabweichung, $n = 19$, $L_{\max} = 416$ kb) nachgewiesen. In einem Chromatinabschnitt lassen sich sowohl pTS5- und pTS4.1-Hybridisierungssignale detekieren. Ausschließlich pTS4.1-Sequenzen wurden über eine Länge von 106 ± 40 kb (Mittelwert \pm Standardabweichung, $n = 17$; $L_{\max} = 177$)

beobachtet. Die Daten, die durch die erste Versuche ermittelt wurden, liegen innerhalb der unteren Standardabweichung der Wiederholungsmessung. Eine größere Streckung der Chromatinfasern aus frischen und jungen Material und ein dadurch höherer Anteil an ungebrochenen und langgestreckten Fasern ist wahrscheinlich für die veränderten mittleren Längenwerte der Wiederholungsversuche verantwortlich. Die Messwerte aus den zweite Vermessungen scheinen daher die tatsächlichen Größen der Repeatblöcke genauer zu repräsentieren.

Da das Minichromosom mitotisch stabil segregiert wird, muss es funktionelle Centromersequenzen enthalten. Unter Annahme, dass die ermittelten maximalen Längendaten einen optimal getreckten und ununterbrochenen Centromerbereich repräsentieren, läßt sich die Centromerlänge in PRO1 auf ca. 450 – 519 kb abschätzen, wodurch die ungefähre Größe einer noch funktionellen Centromerregion in der Gattung *Beta* dargestellt wird.

Weiterhin wurde durch Doppelhybridisierung des Ty3-*gypsy*-Retroelements (pBP10) und des pTS5-Satellitenrepeats, das Vorhandensein von komplexen DNA-Strukturen wie Retrotransposonsequenzen innerhalb der centromerischen Region des PRO1-Fragments nachgewiesen (Abb. 13F).

Abb. 13: (A-I) Detektion und physikalische Kartierung des Wildrübenfragments in der Linie PRO1: Identifizierung des akrozentrischen Fragments durch FISH der wildrübensspezifischen *Sau3A*-Satelliten pTS5 (rot) und pTS4.1 (grün) an (A-B) Metaphase- und Interphasechromosomen; (C-D) Pachytänchromosomen (D) Vergrößerter Bildausschnitt aus (C).

(E) Feinkartierung durch *fib*re-FISH an Chromatinfasern der Fragmentadditionslinie PRO1. Der Satellit pTS5 wird nur an einer Seite von pTS4.1-Sequenzen begrenzt. (F) Nachweis des Ty3-*gypsy*-Elements pBP10 (rot) auf dem Chromosomenfragment von PRO1. Zur Verifizierung der Hybridisierung wurde der *B. vulgaris*-spezifische, pericentromerische *Bam*HI-Satellit (pBV1) eingesetzt (grün). (G) *In situ*-Hybridisierung des subtelomerischen Satelliten pAV34. Ein starkes grünes Hybridisierungssignal ist nur auf einer Seite des schwach DAPI-gefärbten Fragments sichtbar. (H-I) FISH des *Eco*RI-Satelliten pEV1 an Pachytänchromosomen. Auf den *B. vulgaris*-Chromosomen ist der Satellit interkalar, auf dem Fragment von PRO1 (wie auch in *B. procumbens*) pericentromerischen lokalisiert und dem *Sau3A*-Satelliten eng benachbart. (Pfeile deuten jeweils auf das Chromosomenfragment mit dem Hybridisierungssignal.)

(J-P) **Strukturanalyse des Fragments in der Linie PAT2:** (J-K) Identifizierung des Fragments durch FISH der *Sau3A*-Satelliten pTS5 (rot) und pTS4.1 (grün). (L-M) Nachweis der nicht-terminalen Position des pTS5-Satelliten auf dem Fragment im Pachytänstadium. (N) Detektion des pTS4.1-Satelliten in nicht-terminaler Position. (Pfeile deuten jeweils auf das Chromosomenfragment mit dem Hybridisierungssignal.) (O) Organisation der pTS4.1-Repeats entlang gestreckter Chromatinfasern (*fib*re-FISH). pTS4.1-Repeats sind in zwei deutlich voneinander getrennten Blöcken angeordnet. (P) Doppelhybridisierung von pTS4.1- (grün) und pTS5-Repeats (rot) auf Chromatinfasern von PAT2 weist auf Kolo-kalisation beider Satellitenfamilien über den gesamten detektierten Bereich hin.

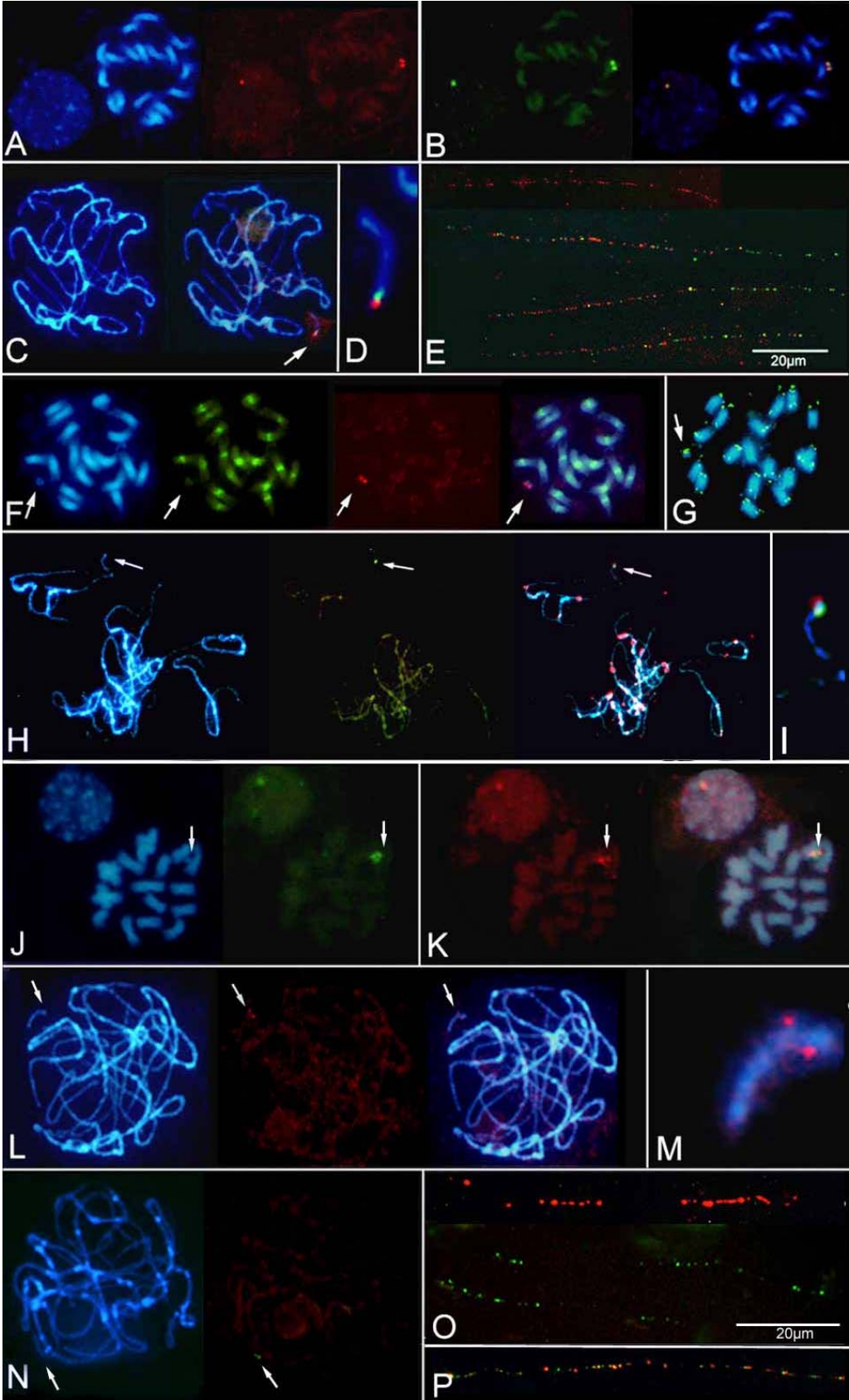


Abb. 13

Die Struktur des Chromosomenfragments in der nematodenresistenten Zuckerrübenlinie PRO1 wurde weiterhin durch Hybridisierung des *Eco*RI-Satellitenrepeats pEV1 analysiert. Die *Eco*RI-Satellitensequenz liegt in *B. vulgaris* in interkalaren Chromosomenregionen hochamplifiziert vor. In *B. procumbens* war die Wiederholungseinheit nur in geringer Kopienzahl im pericentromerischen Bereich nachweisbar. Das Monomer pEV1 wurde als Sonde für die FISH auf meiotischen Pachytänchromosomen der Fragmentadditionslinie PRO1 eingesetzt. Auf den Zuckerrübenchromosomen ist die Hybridisierung des *Eco*RI-Satelliten auf den heterochromatischen interkalaren Chromatinregionen deutlich detektierbar. Zur Identifizierung des Fragments wurde simultan eine Hybridisierung mit pTS5 als Sonde durchgeführt. Das Hybridisierungssignal des pTS5-Repeats lag terminal auf dem Fragment. Das Hybridisierungssignal des pEV1 wurde dicht neben dem pTS5-Signal detektiert. Eng benachbart und auch zwischen den pTS5-Repeatblöcken sind demnach auch kleinere Cluster des *Eco*RI-Satelliten lokalisiert (Abb. 13H-I). Der Nachweis des Ty3-*gypsy*-Elements (pBP10) und des *Eco*RI-Satelliten in PRO1 korreliert mit den Beobachtungen im Centromer der Wildrübe *B. procumbens* und bestätigte das Centromermodell in Abb. 11.

Nach der proximalen Lokalisierung des pTS5-Satelliten auf dem Chromosomenfragment stellte sich die Frage, ob telomerische oder subtelomerische Satellitensequenzen das Fragment abschließen. Simultane *in situ*-Hybridisierung des pTS5-Repeats zur Detektion des Fragments und telomerischer Sequenzen lassen deutliche Signale des pLT11 an einem Fragmentende erkennen (nicht dargestellt). Der subtelomerische Satellit (pAV34) wurde ebenfalls nur auf einem Chromosomenarm lokalisiert (Abb. 13G). *Multi-colour* FISH zeigte, dass diese Signale nicht benachbart zu den pTS5-Loci liegen, sondern auf dem entgegengesetzten Chromosomenarm lokalisiert sind (T. SCHMIDT, pers. Mitteilung). Dies deutet darauf hin, dass distal des pTS5-Satellitenblocks keine oder nur eine geringe Anzahl von Kopien der pLT11- oder pAV34-Repeats vorhanden sind. Auch in *fibres*-FISH-Experimenten an Chromatinfäden aus PRO1 konnten nur getrennt auftretenden pTS5 oder pLT11-Signallinien und keine zusammenhängenden Signalfolgen von pTS5 und pLT11 beobachtet werden. Dadurch wurde die Vermutung bestätigt, dass das Fragment auf einer Seite nicht durch telomerische Sequenzen abgeschlossen wird.

3.4.2.2. Physikalische Feinkartierung des monosomen Chromosomenfragments in der Fragmentadditionslinie PAT2

Nach den Untersuchungen der Fragmentstruktur in der Linie PRO1, wurden vergleichende Untersuchungen an der nematodenresistenten Fragmentadditionslinie PAT2 durchgeführt. PAT2 enthält ein Chromosomenfragment aus der Wildrübe *B. patellares*, das aufgrund seiner Größe und des geringen Anteils an heterochromatischen Sequenzen nur schwer im Mikroskop zu identifizieren ist. Im Vergleich zur Länge des Chromosomenfragments in PRO1 ist das Fragment in PAT2 kleiner, wird aber ebenfalls mitotisch stabil an die Tochterkerne weitergegeben. Funktionelle Strukturen der Centromerregion, die ein Anheften der Mikrotubuli an die Kinetochorproteine ermöglichen, sind demnach auf dem Fragment vorhanden. Die meiotische Stabilität (PAT2: 18,3%) ist im Vergleich zu PRO1 (PRO1: 34,8%) stark reduziert (BRANDES *et al.*, 1987; BRANDES, 1992). Vergleichende Untersuchungen der Fragmente könnten auf die Strukturen innerhalb der centromernahen Regionen hinweisen, die einen wesentlichen Einfluß auf die Funktionalität der Centromere ausüben.

Im Genom der Fragmentadditionslinie PAT2 war durch FISH mit den genom-spezifischen *Sau3A*-Satellitenrepeats pTS5 und pTS4.1 als Sonden eine eindeutige Identifizierung des Fragments möglich (Abb. 13J+K). Ein starkes pTS4.1- und ein schwaches pTS5-Hybridisierungssignal wiesen darauf hin, dass das pTS4.1-Repeat in höherem Amplifikationsgrad vorliegt. Die unterschiedlichen Fluoreszenzintensität der Satellitensequenzen korreliert mit den Beobachtungen im Elterngenom *B. patellaris* (Abb. 10L). Die Fluoreszenzintensitäten der Hybridisierungssignale der pTS4.1-Sonde waren auf den meisten der *B. patellaris*-Chromosomen stärker als die der pTS5-Sonde. Für eine Feinkartierung der centromerischen Region des PAT2-Chromosomenfragments wurden zunächst Untersuchungen an langgestreckten Pachytänchromosomen und Chromatinfäden durchgeführt. Die Präparation von PAT2-Pachytänchromosomen erwies sich als schwierig, da die Mazeration des Gewebes trotz verlängerter Inkubationszeiten häufig nicht ausreichend war, was auf eine veränderte Zusammensetzung der Zellwand, der Kutikula oder der Epidermis hinweisen könnte. Weiterhin war nur in 0,1- 0,5% der Nuklei das Chromosomenfragment peripher lokalisiert; nur an freiliegenden Fragmenten ist aber eine strukturelle Analyse möglich.

In situ-Hybridisierung auf Pachytänchromosomen zeigten Signale des pTS5-Satelliten, die deutlich nicht am terminalen Ende des Fragments lokalisiert waren (Abb. 13L+M). Nach simultaner *in situ*-Hybridisierung unterschiedlich markierter Satelliten an

Pachytänchromosomen konnten nur sehr schwache Signale detektiert werden, wobei die geringe Signalstärke durch die verminderte Qualität der Präparate und nicht durch einen niedrigen Amplifikationsgrad verursacht wurde. Eine genauere Positionierung beider Satellitensequenzen zueinander war nicht eindeutig möglich.

Deshalb wurden für die Feinkartierung des Fragments gestreckte Chromatinfasern aus PAT2-Pflanzenmaterial präpariert. Eine Kontrolle der Präparate durch DAPI-Färbung zeigte relativ kurze Chromatinfasern, die sich nur über einen eng begrenzten Bereich des Objektträgers ausbreiteten. Weder durch eine neu bereitete Kernsuspension noch Veränderungen in der Präparation der Chromatinfäden (z.B. Inkubationzeit des Lysepuffers, Fließgeschwindigkeit der lysierten Kernsuspension über den Objektträger oder Vorbehandlung der Objektträger) konnte eine Verbesserung der Präparate erreicht werden. Erste Analysen mittels *fibres*-FISH wurden daher zunächst an den vorhandenen Präparaten durchgeführt. Trotz der präparativen Schwierigkeiten konnten strukturelle Einsichten in den Aufbau des PAT2-Chromosomenfragments gewonnen werden.

Die *in situ*-Hybridisierung des pTS4.1-Repeats zeigte zwei *Sau3A*-Repeatblöcke, die durch eine Lücke unterbrochen wurden (Abb. 13O). Simultane *in situ*-Hybridisierung der pTS4.1- und pTS5-Repeats als Sonden an Chromatinfäden deuteten auf eine Kolo-kalisierung beider Satelliten hin (Abb. 13P). Abschnitte, in denen nur Signale eines Satelliten detektiert wurden, konnten nicht nachgewiesen werden. Aufgrund der Schwierigkeiten bei der Herstellung geeigneter Präparate mit PAT2-Material können die Daten nur als Hinweis interpretiert werden, dass die Anordnung der Repeatblöcke in PAT2 von der Organisation in der Fragmentadditionslinie PRO1 abweicht. Die andere Organisation und die Position der *Sau3A*-Satelliten in interner Region des PAT2-Fragments deuten auf unterschiedliche Vorgänge bei der Bildung des PAT2-Fragments und des PRO1-Fragments hin. Während die Ergebnisse vermuten lassen, dass sich das PRO1-Fragment nach einem Bruch innerhalb der centromerischen Chromosomenregion gebildet hat; scheint das PAT2-Fragment durch Spaltung im interkalaren Chromosomenbereich entstanden.

3.4.3. Nachweis von Wildrübenchromatin in nematodenresistenten Tranlokationslinien mit unikalen Sequenzen als Sonden

Resistente monosome Additionslinien und Fragmentadditionslinien besitzen einen hohen Anteil von Wildrübeneigenschaften und sind daher für den Einsatz in der Landwirtschaft ungeeignet. Ziel der Züchtung sind resistente homozygote Zuckerrübenlinien, bei der Chromatin der Wildrübe in Form einer möglichst kleinen, nur die gewünschten Wildrübengene enthaltenden, Translokation auf einem Zuckerrübenchromosom integriert ist. Nach einem langwierigen Züchtungsprozess konnte die resistente Linie A906001 entwickelt werden, die eine Translokation von rund 1000 kb aus der Wildrübe *B. procumbens* besitzt und sich in ihrem Phänotyp nur gering von der Zuckerrübe unterscheidet (JUNG *et al.*, 1992, KLEINE *et al.*, 1995).

Da eine Lokalisierung der Wildrübentranslokation im Genom der Linie A906001 durch FISH mit repetitiven wildrübenspezifischen DNA-Sonden (z.B. pTS5) aufgrund der sehr geringen Kopienanzahl auf der kurzen Translokation nicht möglich war, wurden zur Detektion des Wildrübenchromatins YACs eingesetzt, deren Insertion aus translokationsspezifischer DNA bestand. Die verwendeten YACs entstammten einer YAC-Bank aus der Linie A906001 und sind Bestandteile von Contigs, die aufgrund von Daten aus molekularer Analysen der Translokation erstellt wurden (KLEINE *et al.*, 1995; CAI *et al.*, 1997). Durch die Möglichkeit des chromosomalen Nachweises von unikalen Sequenzen durch Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung sollte die Voraussetzung für die physikalische Kartierung von Genen im *Beta*-Genom geschaffen werden. Der direkte chromosomale Nachweis von YACs erlaubt die Bestimmung ihrer Position und Anordnung und die Ausrichtung von YAC-Contigs auf dem Chromosom.

3.4.3.1. Lokalisierung und Positionierung von translokationsspezifischen YACs in der Translokationslinie A906001

Die Translokation der homozygoten, nematodenresistenten Rübenlinie A906001 wurde durch Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung mit den translokationsspezifischen Klonen YAC120 und YAC128 lokalisiert und nachfolgend cytogenetisch kartiert. Der für die FISH eingesetzte YAC120 besitzt eine Länge von 150 kb und enthält die Sequenz des Nematodenresistenzgens *HsI^{pro-1}* (KLEINE *et al.*, 1995). Der YAC128 ist 370 kb lang (CAI *et al.*, 1996).

Beide YACs zeigten terminale Hybridisierungssignale im schwach DAPI-gefärbten Bereich homologer Chromosomen (Abb. 14A-C). Das Wildrübenchromatin war auf beiden homologen Chromosomen detektierbar, woraus deutlich wurde, dass die Zuckerrübenlinie

A906001 homozygot für die Translokation ist. Hybridisierungssignale waren jeweils auf beiden Chromatiden der Chromosomen sichtbar. Um die relative Lage der YACs zueinander zu ermitteln und aufzuklären, welche Sequenz in distaler Position liegt, wurden durch *multi-colour* FISH beide YACs simultan auf der Wildrübentranslokation lokalisiert. Dadurch war es möglich, die die Translokation überspannenden YAC-Contigs und damit die physikalische Karte der Translokation in Bezug zum Centromer und Telomer zu orientieren. Um das entsprechende Auflösungsvermögen zu erreichen, war es notwendig, meiotische Chromosomen zu präparieren, da diese relativ dekondensiert vorliegen und damit größere Zielsequenzen bieten. Durch *in situ*-Hybridisierung der YACs an Chromosomen in verschiedenen Meiosestadien wurde gezeigt, dass der YAC120 terminal und der YAC128 proximal auf der Translokation lokalisiert ist (Abb. 14D). Die Hybridisierungssignale beider YACs überlappten nicht, waren jedoch nur wenig voneinander entfernt. Da das Auflösungsvermögen der FISH an Pachytänchromosomen um etwa 50-100 kb liegt (DEJONG *et al.*, 1999) und eine Lücke zwischen beiden Signalen deutlich zu erkennen war, wurde vermutet, dass die Distanz zwischen den YACs und damit zwischen den beiden, die Translokation zum größten Teil abdeckenden Contigs ungefähr 100-200 kb groß ist.

Aus den oben beschriebenen *multi-colour* FISH-Experimenten war bekannt, dass YAC120 am Chromosomenende lokalisiert ist. Es stellte sich die Frage, ob die YAC120-Sequenz das Chromosom abschließt oder ob terminal zusätzliche telomerisch oder subtelomerische Sequenzen vorhanden sind. Deshalb wurden weitere Experimente an Pachytänchromosomen durchgeführt. Für die *multi-colour* FISH wurden YAC120 und die Telomerssequenz (TTTAGGG)_n pLT11 eingesetzt. Die mikroskopische Auswertung ergab, dass YAC120 unmittelbar an den Telomerbereich angrenzt (Abb. 14E). Damit erscheint es unwahrscheinlich, dass sich weitere distal lokalisierbare YAC-Klone aus der YAC-Bank (KLEINE *et al.*, 1995) isolieren lassen.

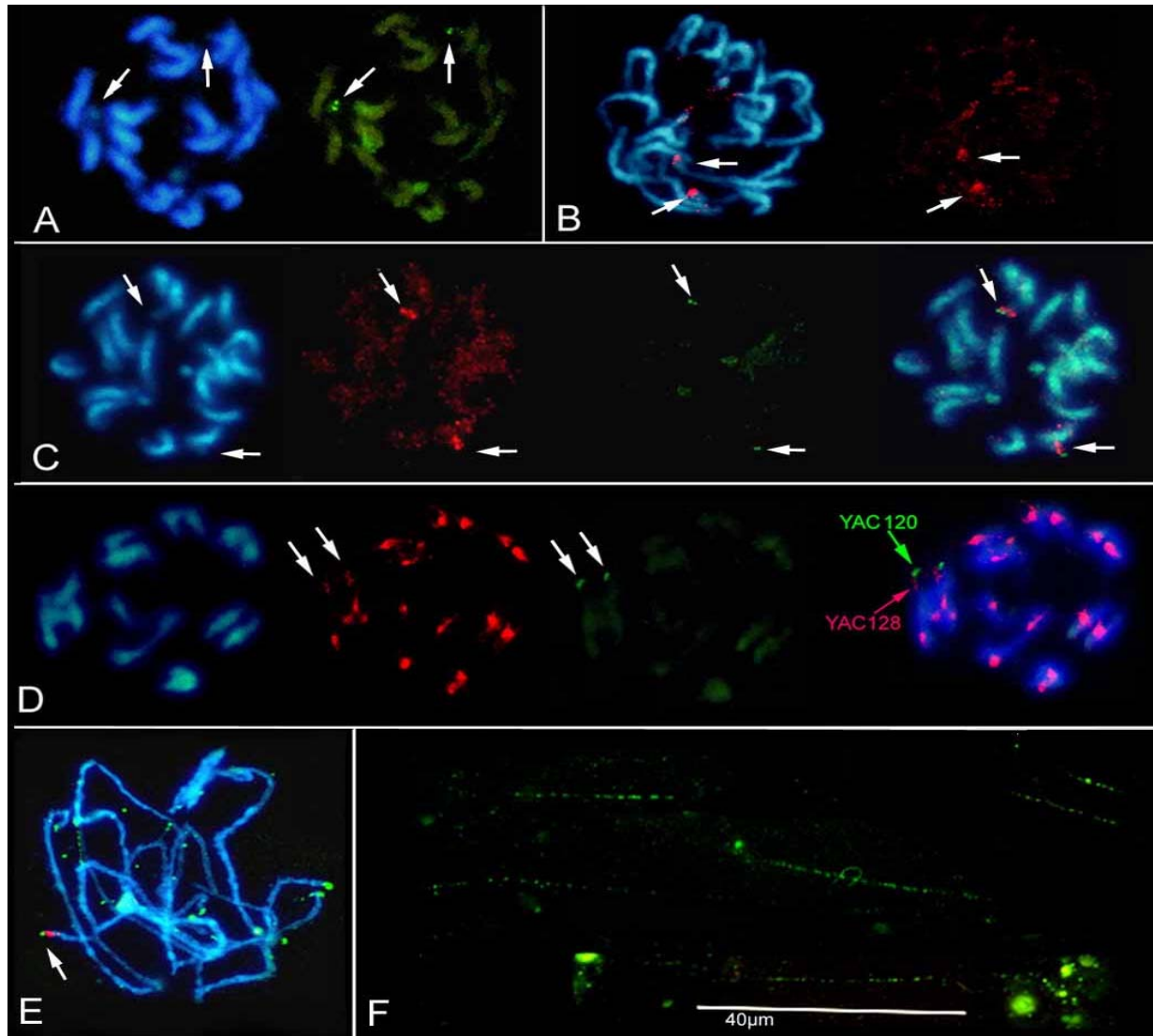


Abb. 14: Lokalisierung und physikalische Kartierung der Wildrübentranslokation auf Chromosomen der homozygoten resistenten Linie A906001 von *B. vulgaris*:

Pfeile deuten jeweils auf die translokationsspezifischen Hybridisierungssignale.

(A-C) Lokalisierung der Wildrübentranslokation durch FISH an mitotischen Chromosomen. Beide YACs sind terminal auf einem Chromosomenpaar lokalisiert. (A) Hybridisierung des YAC120 (150 kb). (B) Hybridisierung des YAC128 (370 kb). (C) Doppelhybridisierung des YAC120 (grün) und des YAC128 (rot).

(D) Bestimmung der exakten Position und relativen Lage durch *multi-colour* FISH mit YAC120 (grün) und YAC128 (rot) an meiotischen Chromosomen (Diakinese). Lokalisierung des YAC120 distal und YAC128 proximal. Zusätzliche Hybridisierung einer dritten DNA-Sonde (*Bam*HI-Satellitenrepeat pBV1) zur Markierung der Centromere (rot, starke Signale).

(E) *Multi-colour* FISH von YAC120 (rot) und Telomerrepeats (grün-gelb) an Pachytänchromosomen zeigt die endständige Lage des YAC120 und seine physikalische Kopplung zum Telomer.

(F) Vermessung der Insertionsgröße des YAC120 durch *fibre*-FISH: der YAC120 wurde über einen Bereich von 116 ± 23 kb detektiert. Hybridisierung des YAC120 (grün) an Chromatinfasern der Translokationslinie A906001.

Um die Struktur der Translokation durch hochauflösende *fibre*-FISH-Eyperimente untersuchen zu können, wurden gestreckte Chromatinfasern der Translokationslinie A906001 mit YAC120 als Digoxigenin-markierte Sonde hybridisiert (Abb. 14F). Auf den Chromatinfasern der Linie A906001 wurden spezifische Signallinien einer durchschnittlichen Länge von $35 \pm 7 \mu\text{m}$ ($n = 19$; $L_{\text{max}} = 152 \mu\text{m}$) detektiert. Wird daraus die korrelierende DNA-Größe mit dem durch FRANSZ *et al.* (1996a) bestimmten optimalen Streckungsfaktor von $3,27 \text{ kb}/\mu\text{m}$ berechnet, ergibt sich ein Wert von ca. $116 \pm 23 \text{ kb}$ für die Insertionsgröße des YAC120. Durch Pulsfeldgelelektrophorese wurde eine Größe von ca. 150 kb bestimmt. Die Differenz zwischen beiden Messdaten könnte durch eine geringere Streckung der Chromatinfasern oder zu geringe Signalintensität in den terminalen Bereichen der Chromatinfasern verursacht worden sein.

Unikalen Sequenzen, wie sie der YAC120 darstellt, wurde bisher nur selten auf gestreckten Chromatinfasern aus Pflanzenmaterial lokalisiert. Die Hybridisierungen von BAC-Klonen an Chromatinfasern wurden von CHENG *et al.* (2000a) und LYSAK *et al.* (2001) erfolgreich durchgeführt. Die Hybridisierung einer YAC-Sonde ist bisher nicht beschrieben und stellt demnach einen weiteren Schritt zur Detektion von *low-copy* und unikale Sequenzen auf Chromatinfasern aus pflanzlichem Gewebe und insbesondere der Gattung *Beta* dar.

3.4.3.2. Ursache für die verminderte Transmission in nematodenresistenten

Zuckerrübenlinien

Der Nachweis der Translokation in verschiedenen meiotischen Stadien durch YAC-*in situ*-Hybridisierung (Kap. 3.4.3.1.) führte zu Hinweisen auf die Ursache der bei der Sortenentwicklung beobachteten verminderten Transmission der Resistenz. Obwohl das Resistenzgen in den Translokationslinien auf einem Zuckerrübenchromosompaar als homozygote Introgression vorliegt, ist die Stabilität der Vererbung (Transmissionsrate) nicht befriedigend (J. MÜLLER, pers. Mitteilung). So spalten aus der Nachkommenschaft homozygoter resistenter Linien immer wieder anfällige Pflanzen heraus, die vermutlich aus dem spontanen Verlust des Nematodenresistenzgens resultieren (BRANDES *et al.*, 1987). Deshalb konzentrierten sich die Analysen auf die Untersuchung verschiedener Meiosestadien in der Translokationslinie A906001. Obwohl YAC128 nicht das Nematodenresistenzgen trägt, wurde dieser Klon als FISH-Sonde ausgewählt, da die Fluoreszenzsignale eine höhere Intensität als die des YAC120 haben. Der YAC128 ist dem YAC120 eng benachbart und kann daher zum Nachweis der Translokation im Genom von *B. vulgaris* eingesetzt werden.

Durch FISH des translokationsspezifischen YAC128 wurde gezeigt, dass Erkennung und Paarung homologer Chromosomen in der meiotischen Prophase durch die

Wildrübenintrogression nicht behindert wurden. Im späten Leptotän waren zwei Signale auf zwei nebeneinander lokalisierten Chromatinfäden nahe beieinander zu erkennen (Abb. 15A). Die beiden homologen Chromosomen lagen folglich eng benachbart. Das Pachytänstadium ist durch die vollständige Paarung homologer Chromosomen gekennzeichnet. Wie zu erwarten war, ließ sich der YAC128 als relativ starkes Signal terminal auf einem Bivalent detektieren (Abb. 15B). Weiterhin sind schwächere Signale, die dispers über alle Chromosomen verteilt sind, zu beobachten. Aufgrund der geringen Signalintensität lassen sie sich deutlich vom YAC128-Hybridisierungssignal differenzieren. Die schwachen Signale deuten auf das Vorhandensein von dispersen DNA-Sequenzen innerhalb der YAC128-Insertion.

Störungen traten in den nachfolgenden Stadien der Meiose auf. In der Diakinese, Anaphase I und Telophase I wurden in 7-16% der Pollenmutterzellen Unregelmäßigkeiten bei der Chromosomenverteilung beobachtet (Abb. 15C-E). Analysiert wurden insgesamt 900 Nuklei, die aus 7 verschiedenen Antheren bzw. Präparaten gewonnen wurden und aus zwei unterschiedlichen Blütenständen einer Pflanze entstammten. Diese Stadien wurden durch Hybridisierung mit YAC128 untersucht. Ausgewählte Beispiele dieser FISH-Ergebnisse wurden dokumentiert und sind in Abb. 15 dargestellt.

- Während der Diakinese bildete sich eine deutlich verlängerte Brücke zwischen zwei homologen Chromosomen eines Bivalents, auf der die translokationsspezifische Sequenzen des YAC128 detektiert wurden (Abb. 15C). Es handelt sich demzufolge um das Chromosomenpaar mit der Translokation.
- Im Anaphasestadium wurde ein verzögerter Transport eines Chromosoms zu den Spindelpolen beobachtet. Dieses Chromosom hybridisierte stark, ebenso wie ein Chromosomenbruchstück, mit den Wildrübensequenzen des YAC128. Sowohl das hybridisierende Chromosom als das Chromosomenfragment waren von den restlichen Chromosomen separiert, die schon zu den Polen gezogen wurden (Abb. 15D). Ein weiteres Bruchstück in der Mitte ohne Hybridisierungssignal ist sichtbar.
- In der Telophase I wurde zwischen den beiden Tochterkernen ein Chromosomenfragment detektiert, das mit dem translokationsspezifischen YAC128 hybridisierte. Während ein Tochterkern ein spezifisches Signal zeigte, ließ sich im anderen Kern keine spezifische Hybridisierung des YAC128 nachweisen (Abb. 15E).
- Beobachtungen in der zweiten Teilungsphase der Meiose zeigten, dass eine gestörte Verteilung der Chromosomen nicht auf die erste Teilungsphase beschränkt war. Auch in Anaphase II und Telophase II bildeten sich Brücken zwischen den sich trennenden Chromatidenpaaren, und abgespaltene Mikronuclei waren nach DAPI-Färbung

nachweisbar (Abb. 15F+G). Eine Brückenbildung wurde in der zweiten Teilungsphase bei 5% der untersuchten Nuclei beobachtet (je 100 Nuclei aus 3 unterschiedlichen Antheren wurden analysiert).

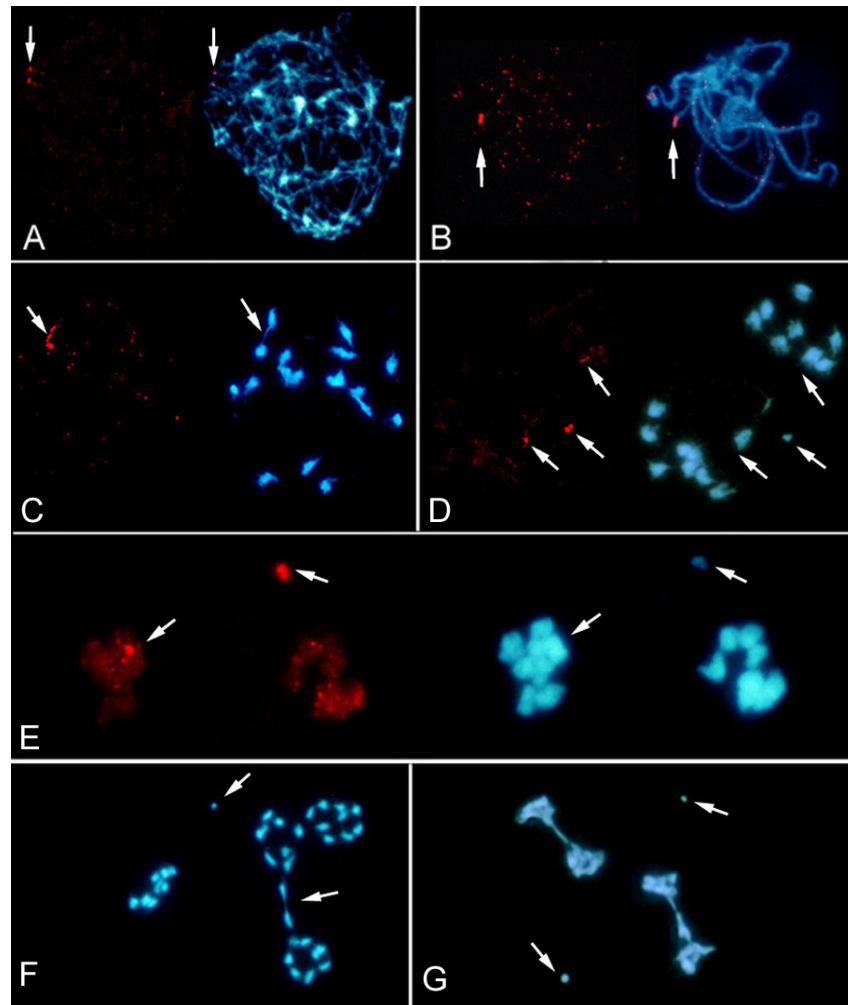


Abb. 15: Meiotische Stabilität der Translokation: Lokalisierung der Wildrübens-translokation in verschiedenen meiotischen Stadien der nematodenresistenten Translokationslinie A906001 durch FISH mit YAC128.

(A) Spätes Leptotän; (B) frühes Pachytän; (C) Diakinese; (D) Anaphase I; (E) Telophase I; (F) Anaphase II; (G) Telophase II. Bei (A-B) lassen sich keine Störungen in der Assoziation und Paarung der homologen Chromosomen nachweisen. (C) In der Diakinese bildet die Translokation eine Brücke zwischen zwei homologen Chromosomen. (D-G) In der späten Prophase und den Teilungsphasen I und II sind Unregelmäßigkeiten bei der Aufteilung der Chromosomen auf die Tochterzellen (D-F) zu beobachten. In der Telophase I konnte die vollständige Abtrennung des translokations-tragenden Chromosomenabschnittes beobachtet werden. (F-G) In der Teilungsphase II ist ebenfalls Brückenbildung und die Abtrennung von Chromosomenbruchstücken zu beobachten.

Zusammenfassend konnte durch FISH-Analyse bestätigt werden, dass die Wildrübens-translokation in der A906001 zu unregelmäßiger Verteilung der homologen

Chromosomen in der ersten Teilungsphase der Meiose führen kann. Mikroskopische Beobachtungen zeigten weiterhin, dass auch bei der Teilung der Chromatiden (2. meiotische Teilung) Störungen auftreten können. In beiden Fällen sind abseits liegende Chromosomenbruchstücke zu beobachten. Diese enthalten sehr wahrscheinlich das Nematodenresistenzgen und werden vermutlich in den folgenden Stadien abgebaut. Es scheint daher, dass diese nachgewiesenen meiotischen Störungen der translokationstragenden Chromosomenregionen für die verminderte Transmission der Translokationslinie verantwortlich sind.

3.4.3.3. Lokalisierung translokationsspezifischer Sequenzen auf Chromosomen der monosomen Additionslinie und der Wildrübe

Nematodenresistente Zuckerrübenlinien entstanden durch Introgression von Segmenten eines Wildrübenchromosoms aus monosomen Additionslinien ($2n = 18+1$). Die monosome Additionslinie war aufgrund ihres Phänotyps und Isoenzymmusters als „a-Typ“ klassifiziert und enthält das Chromosom 1 von *B. procumbens*, auf dem sich das Nematodenresistenzgen *HsI^{pro-1}* befindet (JUNG *et al.*, 1992; JUNG, 1987).

Um die molekulare Organisation der translokationspezifischen Sequenzen besser zu verstehen und Hinweise auf unbekanntere repetitive Sequenzen in den YACs zu bekommen (siehe Hintergrundsignale in Abb. 14C und Abb. 15F), wurden die selektierten YACs auf den Chromosomen der monosomen Additionslinien und der Wildrübe *B. procumbens* hybridisiert. Die chromosomale Herkunft der Resistenzgen-tragenden DNA-Sequenzen sowie Hinweise auf den Entstehungsprozess der Hybridlinien sollten untersucht werden.

Durch FISH mit YAC120 auf der monosomen Additionslinie und der Wildrübe *B. procumbens* wurden starke Hybridisierungssignale am perizentrischen, DAPI-positiven Heterochromatin hervorgerufen. In der monosomen Additionslinie ist die Centromerregion des zusätzlichen Chromosoms stark markiert und ermöglicht die eindeutige Identifizierung des Wildrübenchromosoms (Abb. 16A Mitte). Die Hybridisierung von YAC120 an meiotischen Chromosomen der Wildrübe *B. procumbens* ergab unterschiedlich starke Signale an 10 bis 12 perizentrischen Heterochromatinblöcken (Abb. 16B Mitte). Die Signalverteilung stimmte mit dem durch die *Sau3A*-Satellitenrepeats verursachten Hybridisierungsmuster überein (Abb. 10A-D).

Der YAC120 enthält einige Kopien der *Sau3A*-Satelliten-DNA-Familie, die in *B. procumbens* in pericentromerischen Chromosomenregionen hochampliziert vorliegt und als molekularer Marker für die Selektion nematodenresistenter monosomer Additionslinien eingesetzt werden kann (SCHMIDT *et al.*, 1990). Wird der YAC120 als FISH-Sonde eingesetzt, detektiert er die

Satellitenarrays am Centromer der Wildrübenchromosomen, die als Zielsequenzen hochabundant vorliegen. Da der YAC120 sowohl in der monosomen Additionslinie als auch in der Wildrübe sehr stark an die repetitiven Satellitenblöcke hybridisiert, ist keine eindeutige Lokalisierung des Resistenzgens möglich. Ein überraschendes Ergebnis brachte die Hybridisierung des YAC128 in der monosomen Additionslinie. Hier wurde das zusätzliche Wildrübenchromosom vollständig markiert. Die Hybridisierung an weniger stark kondensierten meiotische Chromosomen zeigte, dass im Bereich des perizentrischen Heterochromatins des Wildrübenchromosoms keine Hybridisierungssignale auftraten (Abb. 16A rechts).

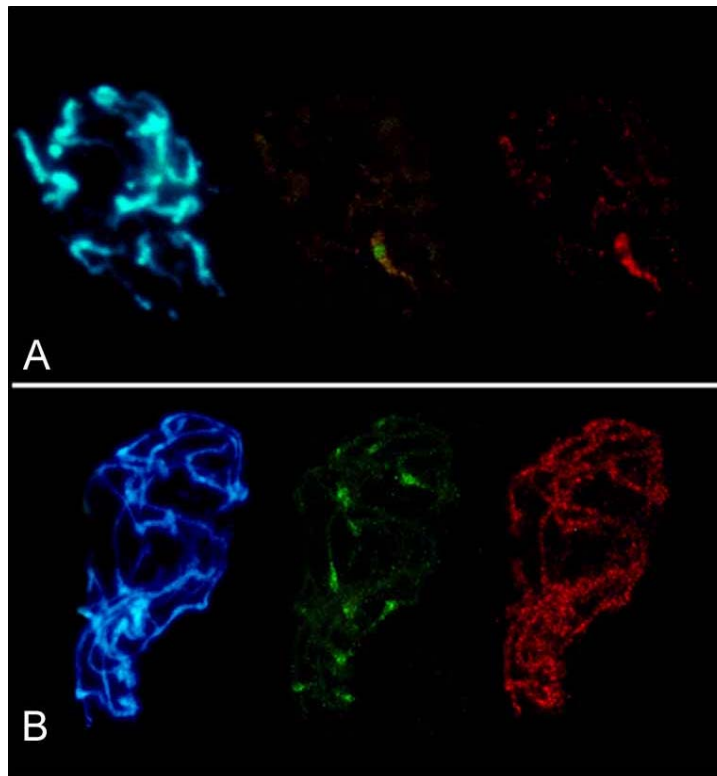


Abb. 16: Vergleichende Hybridisierung der YACs an Additionslinie und Wildrübe:

(A) FISH an meiotischen Chromosomen (Prophase I) der monosomen Additionslinie (18+1) von *B. vulgaris* mit dem translokationsspezifischen YAC120 (grün, Mitte) und YAC128 (rot, rechts).

(B) FISH an meiotischen Chromosomen von *B. procumbens* mit YAC120 (grün, Mitte) und YAC128 (rot, rechts).

Analog zeigten in *B. procumbens* alle Chromosomen starke, dispers verteilte Signale nach der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung mit YAC128 (Abb. 15B rechts). Daraus wurde geschlossen, dass YAC128 eine DNA-Sequenz enthalten muss, die hochamplifiziert im *B. procumbens*-Genom vorkommt, aber nur in wenigen Kopien im *B. vulgaris*-Genom existiert. Ähnliche Verteilungsmuster sind aus Hybridisierungsexperimenten von LTR-Retrotransposons der Ty1-*copia*-Klasse auf Rübenchromosomen bekannt (SCHMIDT *et al.*, 1995). Um die Ursache für diese disperse Hybridisierung zu ermitteln, wurde eine PCR mit Ty1-*copia*-spezifischen Primern durchgeführt (FLAVELL *et al.*, 1992). Dadurch konnte aus dem YAC128 ein Ty1-*copia*-typisches Fragment von 270 bp amplifiziert werden.

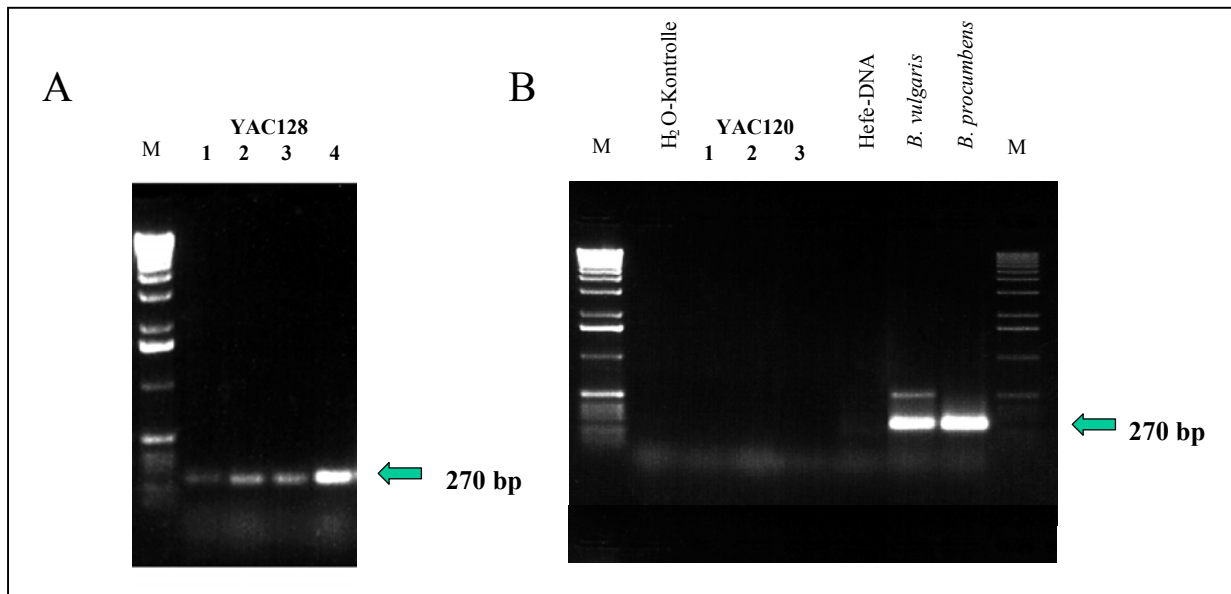


Abb. 17: (A) **Detektion eines Ty1-copia-typischen DNA-Fragments** von 270 bp im 1,2%igem Agarosegel nach Amplifikation der konservierten Region der Reversen Transkriptase durch PCR mit degenerierten Primern. M: 1kb Leiter, YAC128 1-4: unterschiedliche Konzentrationen an YAC128 als Template-DNA: 1/100; 1/20, 1/10 und unverdünntes Amplifikat aus DOP-PCR-Ansatz. (B) **Nachweis der Spezifität:** YAC120 in drei Konzentrationen (1/20; 1/10 und unverdünnt); genomische DNA aus Hefe (*Sacharomyces cerevisiae*), *B. vulgaris* und *B. procumbens* wurden als Template-DNA eingesetzt

Nach Klonierung und Sequenzierung des PCR-Produkts konnte durch Vergleich mit den in der EMBL-Datenbank abgelegten Ty1-copia-Sequenzen eine Homologie festgestellt werden. Die klonierte DNA-Sequenz zeigte 43% Homologie zur DNA-Sequenz des Ty1-copia-Retrotransposons Tbv1 aus *B. vulgaris* (Z38076). Die Homologie zur Tbv1-Sequenz ist sehr wahrscheinlich Ursache für die beobachtete schwache Kreuzhybridisierung des YAC128 mit den Zuckerrübenchromosomen.

Aus den starken Signalen des YAC128 in der FISH-Analyse kann geschlossen werden, dass die aus diesem YAC isolierte und klonierte Reverse Transkriptase-Sequenz zu einer hochamplifizierten Subfamilie von Ty1-copia-Retrotransposons gehört, die sehr spezifisch für das *B. procumbens*-Genom ist.

3.4.3.4. Vergleichende Lokalisierung des Nematodenresistenzgens *Hs1^{pro-1}*

Um eine detaillierte cytogenetische Analyse chromosomaler Regionen zu ermöglichen, sollte der Nachweis von kurzen, unikalen DNA-Sequenzen durch Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung im Genom von *B. vulgaris* erarbeitet und etabliert werden. Voraussetzung für die Hybridisierung von unikale Genen ist die Verwendung von qualitativ hochwertigen Chromosomenpräparaten aus jungem Pflanzenmaterial mit einem hohen Metaphaseindex.

Wichtig ist die sorgfältige Auswahl der Präparate, die gänzlich frei von störenden Cytoplasmaresten sein müssen. Die eingesetzte DNA-Sonde muss hochspezifisch an die Zielsequenz auf dem Chromosom binden. Weiterhin muss die Inkorporation der markierten Nukleotide hocheffizient erfolgen, damit die Fluoreszenzsignale mit ausreichender Intensität erzeugt und detektiert werden können.

Als unikales Gen wurde das in einen Plasmidvektor klonierte Nematodenresistenzgen *HsI^{pro-1}* auf die nematodenresistente Translokationslinie A906001 hybridisiert. Die Sequenz des Nematodenresistenzgen *HsI^{pro-1}* ist Teil des YAC120 (Abb. 19) (CAI *et al.*, 1997). Da die YAC-Hybridisierung ergab, dass die Linie A906001 homozygot ist, wurden Hybridisierungssignale auf einem Chromosomenpaar erwartet. Durch Verwendung unterschiedlicher Primerkombinationen wurden aus dem klonierten Nematodenresistenzgen (Klon 1832) durch PCR DNA-Sonden unterschiedlicher Länge hergestellt und für die FISH eingesetzt (Primer 1832D; 1832H, 1832B und 1832T wurden freundlicherweise von D. CAI zur Verfügung gestellt). Da als Template ein cDNA-Klon in der PCR eingesetzt wurde, umfaßten die PCR-Produkte nur kodierende Sequenzen des *HsI^{pro-1}*-Gens.

Zunächst musste die Sonde selektiert werden, die hoch spezifisch hybridisiert und dabei groß genug ist, um stabil an der genomischen Zielsequenz gebunden zu bleiben. Zu beobachten war, dass nur das kleinste Fragment mit einer Länge von 684 bp spezifisch hybridisierte. Die längeren Sonden zeigten zusätzliche Hybridisierungssignale auf mehreren Zuckerrübenchromosomen. Dies läßt vermuten, dass Kreuzhybridisierung mit Sequenzen kodierend für konservierte Proteindomänen in Zuckerrübe und Wildrübe für die unspezifischen Signale verantwortlich sind.

Nur nach Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung des kürzesten PCR-Produktes von 684 bp wurden Hybridisierungssignale auf nur einem Chromosomenpaar detektiert. Auf jeweils beiden Chromatiden konnten in terminaler Chromosomenregion *HsI^{pro-1}*-Sequenzen nachgewiesen werden. Durch die Hybridisierung der DNA-Sonde des Nematodenresistenzgen *HsI^{pro-1}* auf der Translokationslinie A906001 (Abb. 18A) konnten molekulare Untersuchungen bestätigt werden, die gezeigt hatten, dass das Resistenzgen terminal auf homologen Chromosomen lokalisiert ist (HELLER *et al.*, 1996).

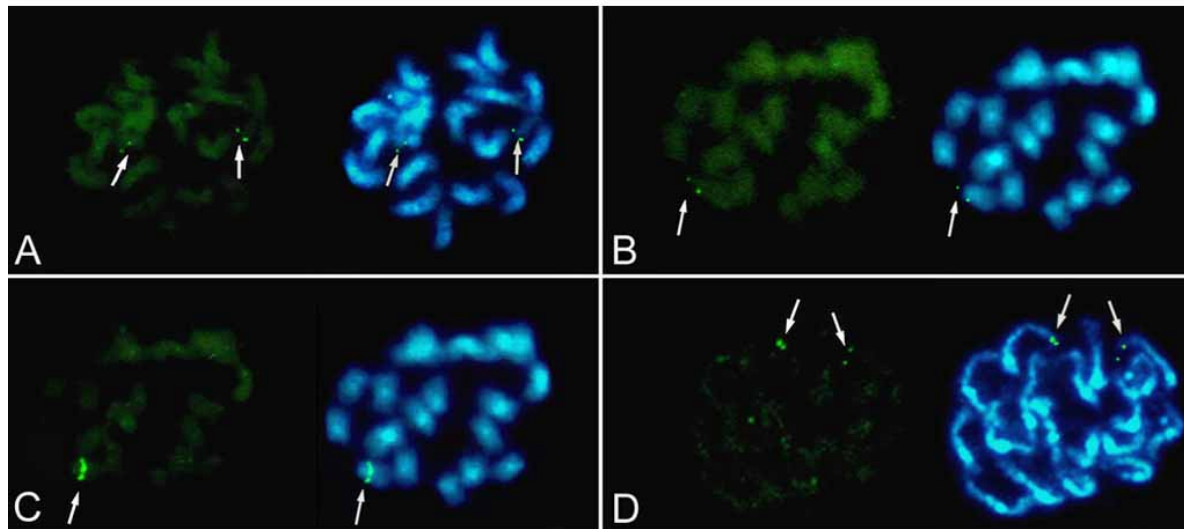


Abb. 18: (A) Chromosomale Lokalisierung des Nematodenresistenzgens HsI^{pro-1} (internes Fragment von 684 bp) in der homozygoten nematodenresistenten Translokationslinie A906001. Hybridisierungssignale (Pfeile) sind auf homologen Chromosomen auf beiden Chromatiden sichtbar. (B) Detektion von HsI^{pro-1} in der monosomen Additionslinie von *B. vulgaris* mit Chromosom 1 von *B. procumbens* (Pfeil); (C) Rehybridisierung mit dem *B. procumbens*-spezifischen Satellitenrepeat pTS5 (Pfeil). (D) Nachweis des Nematodenresistenzgens HsI^{pro-1} in terminaler Position von *B. procumbens*-Chromosomen (Pfeile).

Da durch die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung der YACs auf der monosomen Additionslinie von *B. vulgaris* und der Wildrübe keine Hinweise zur Entstehung der Translokation erzielt wurden, wurden *in situ*-Hybridisierungen der HsI^{pro-1} - Sequenz an Chromosomen der monosomen Additionslinie und der Wildrübe *B. procumbens* durchgeführt. Da die Gensonde nur ein kurzes Fragment der kodierenden Gensequenz enthielt, wurde erwartet, dass eine eindeutige chromosomale Lokalisierung des Nematodenresistenzgens in der monosomen Additionslinie und der Wildrübe möglich ist. Durch Kenntnis der chromosomalen Position des Gens sollte die Frage geklärt werden, welche Rekombinationsereignisse zur Entstehung der Translokation geführt haben könnten.

Die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung der HsI^{pro-1} -Gensequenz an mitotischen Metaphasechromosomen der monosomen Additionslinie zeigte zwei Hybridisierungssignale in terminaler Position an einem Chromosom (Abb. 18B). Zwei schwache Signalpunkte auf beiden Chromatiden waren zu erkennen. Um die Spezifität des beobachteten Fluoreszenzsignals zu bestätigen, war eine zusätzliche Identifizierung des Wildrübenchromosoms notwendig. Dazu wurde eine Rehybridisierung der Chromosomen der monosomen Additionslinie mit dem *B. procumbens*-spezifischen Satelliten pTS5 vorgenommen (Abb. 18C). Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass die HsI^{pro-1} -Gensonde auf dem durch pTS5 identifizierten Wildrübenchromosom hybridisiert. Das

Nematodenresistenzgen HsI^{pro-1} ist demnach auf dem addiertem Wildrübenchromosom terminal lokalisiert.

Um Hinweise auf die chromosomale Herkunft der Gensequenz in der Wildrübe zu erhalten, wurden *in situ*-Hybridisierungsexperimente der HsI^{pro-1} -Gensonde an Prometaphasechromosomen von *B. procumbens* durchgeführt. An den *B. procumbens*-Chromosomen wurden in terminaler Position auf zwei Chromosomen Signale nachgewiesen (Abb. 18D). Die Hybridisierungssignale waren auf beiden Chromatiden detektierbar. Die FISH zeigt, dass die Translokation mit dem HsI^{pro-1} Gen einem terminalen Chromosomenabschnitt eines Wildrübenchromosoms entstammt. Das Nematodenresistenzgen ist die erste unikale Sequenz, die bisher in Wildrüben durch FISH nachgewiesen werden konnte. Die Ergebnisse der chromosomalen Lokalisierung des Nematodenresistenzgens als auch von YAC120 und YAC128 (vgl. Kap. 3.4.3.1.) in *B. procumbens* und in der Translokationslinie A906001 wurden in der nachfolgenden Abbildung (Abb. 19) schematisch dargestellt. Die genom-spezifischen Satelliten pTS5 (*B. procumbens*) (Abb. 18C) und pBV1 (*B. vulgaris*) (Abb. 14D) wurden als chromosomale Marker eingesetzt.

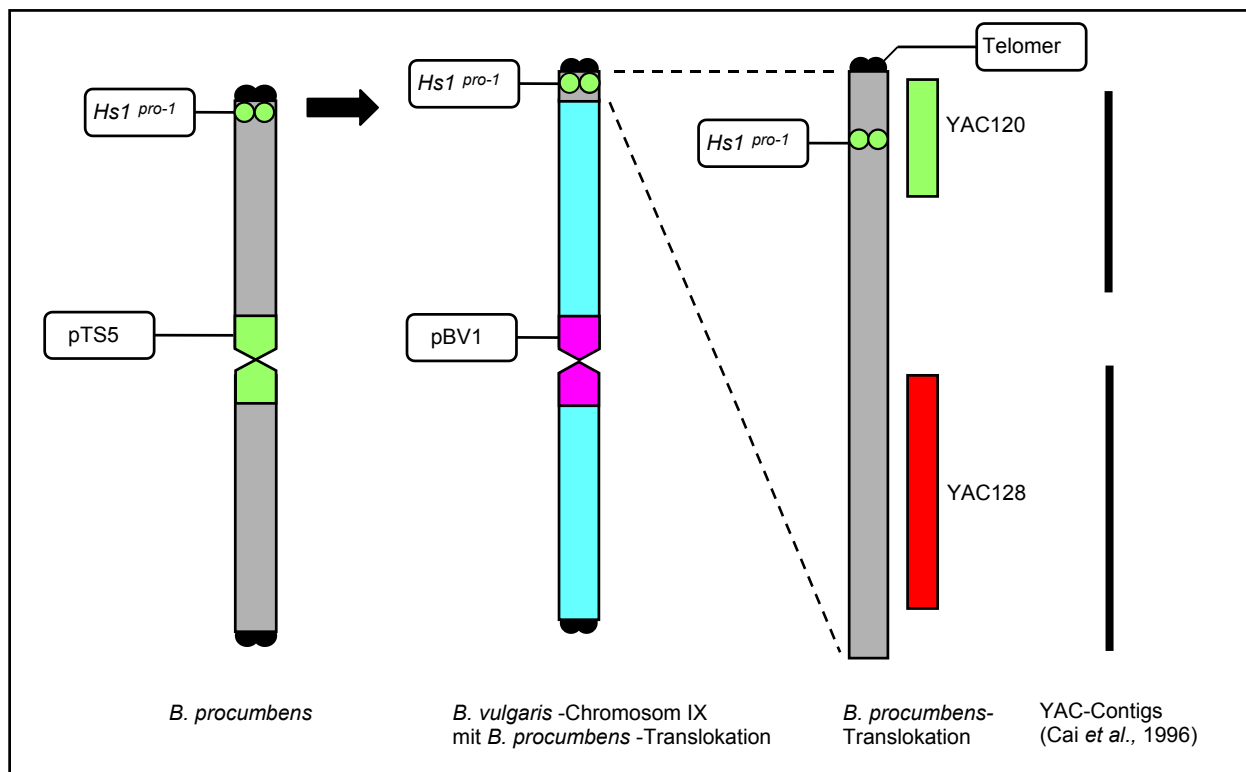


Abb. 19: Schematische Darstellung der Struktur der Translokation und der Lage des Nematodenresistenzgens in der resistenten Rübenlinie A906001. Dargestellt sind die translokationsspezifischen YACs (YAC120 und YAC128), das Nematodenresistenzgen HsI^{pro-1} , *B. procumbens*-spezifisches Satellitenrepeat pTS5 und *B. vulgaris*-spezifisches Satellitenrepeat pBV1.

Durch die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung des Gens *HsI^{pro-1}* ergaben sich Einsichten in den möglichen Ursprung der Translokation. Die Translokation der Zuckerrübenlinie A906001 stammt sehr wahrscheinlich aus einem terminalen Chromosomenabschnitt der Wildrübe. Weiterhin konnte auch die RFLP-Kopplungsanalyse bestätigt werden (HELLER *et al.* 1996). In der RFLP-Analyse verschiedener resistenter Zuckerrübenlinien wurde gezeigt, dass die jeweiligen Translokationen aus den Wildrüben *B. procumbens* und *B. webbiana*, die ein Nematodenresistenzgen tragen, immer endständig in der Kopplungsgruppe 4 kartiert werden können. Die FISH mit YAC120 und dem Telomerrepeat beweist, dass in Bezug auf die Translokation die genetische und die cytogenetische Kartierung übereinstimmen.

3.5. Chromosomale Verteilung von Retrotransposons im pflanzlichen Genom

In den vorangegangenen Kapiteln wurde die chromosomale Lokalisierung verschiedener Satelliten-DNA-Familien der Gattung *Beta* beschrieben. Zu den Hauptklassen der repetitiven DNA im pflanzlichen Genom gehören neben den tandemartig angeordneten Satelliten-DNA-Sequenzen auch transponible DNA-Sequenzen wie Transposons und Retrotransposons. Der Nachweis und die molekulare Charakterisierung der Retrotransposons (als Sequenzklasse der repetitiven DNA) gelang bereits in vielen pflanzlichen Genomen (SMYTH *et al.*, 1993; HESLOP-HARRISON *et al.*, 1997; KUMAR & BENNETZEN, 1999). Ausgangspunkt der eigenen Studien von Retroelementen war die *in situ*-Hybridisierung des YAC128 auf Chromosomen der monosomen Additionslinie von *B. vulgaris*. Eine genomspezifische Verteilung von dispersen Hybridisierungssignalen und die Amplifikation eines Ty1-*copia*-typischen Fragments durch PCR aus dem YAC128 ließen vermuten, daß Retrotransposonsequenzen im YAC128 inseriert und für die zusätzlichen dispersen Signale verantwortlich sind (vgl. Kap. 3.4.3.3.).

Im folgenden ist die Analyse der chromosomalen Verteilung der drei Retrotransposonsequenzklassen im *Beta*-Genom dargestellt. Weiterführend wurden auch Genome anderer Pflanzengattungen untersucht werden, um artübergreifende Prinzipien der Anordnung der Retroelemente pflanzlicher Genome nachzuweisen.

Retrotransposons sind repetitiven Sequenzen, die u.a. für eine RNA-abhängige DNA-Polymerase (RT: Reverse Transkriptase) kodieren und bei ihrer Amplifikation in der Zelle ein RNA-Intermediat bilden. Im pflanzlichen Genom wurden bisher verschiedene Formen von Retroelementen charakterisiert. Sie werden eingeteilt in LTR-Retrotransposons mit langen terminalen Sequenzwiederholungen (LTR: *long terminal repeat*) und Non-LTR-Retrotransposons, die keine terminalen Repeats besitzen (vgl. Tab. 1). Bei den Non-LTR-

Retrotransposons unterscheidet man zwischen SINEs (*short interspersed elements*) (SINGER, 1982; LENOIR *et al.*, 1997) mit Sequenzlängen von ca. 500 bp und LINEs (*long interspersed elements*) mit einer Länge von mehreren Kilobasen und Spacersequenzen (nach SCHMIDT, 1999).

LTR-Retrotransposons lassen sich einteilen in Ty1-*copia*- und Ty3-*gypsy*-Elemente. Sie besitzen eine interne Domäne mit mehreren ORFs (*open reading frames*). Diese enthalten Gene für eine Reverse Transkriptase, eine Protease, eine RNase H und eine Integrase. Ty1-*copia*- und Ty3-*gypsy*-Retrotransposons unterscheiden sich in der Reihenfolge der Gene für die Integrase und Reversen Transkriptase (vgl. Abb. 1).

Die chromosomale Lokalisierung und molekularen Analysen der Reversen Transkriptase Domäne von Ty1-*copia*-Elemente war Bestandteil der eigenen Arbeit. Die Untersuchungen zur chromosomalen Verteilung der Ty3-*gypsy*-ähnlichen Elemente im Genom der Wildrüse *B. procumbens* wurden durch die molekularen Studien zur Charakterisierung von centromernahen Retrotransposons von Frau Dr. I. Galasso (Germplasm Institute Bari, CNR, Italien) unterstützt (GINDULLIS *et al.*, 2001). Ty3-*gypsy*-ähnliche Retroelemente in *Cicer arietinum* wurden in Kooperation mit Frau Dr. C. Staginnus aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Kahl (Plant Molecular Biology, Universität Frankfurt) analysiert (STAGINNUS *et al.*, 1999). In Zusammenarbeit mit Frau Dr. S. Kubis aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Heslop-Harrison (Department of Cell Biology, John Innes Centre, Norwich, UK) wurden Non-LTR-Retrotransposons (LINEs) charakterisiert und chromosomal lokalisiert (KUBIS *et al.*, 1998).

3.5.1. Ty1-*copia*-Retrotransposons der Gattung *Beta*

Sehr gut untersuchte Retrotransposon sind die Ty1-*copia*-Retrotransposons, wobei insbesondere die für die Reverse Transkriptase kodierende Gensequenz (RT-Gen) analysiert wurde. Die Reverse Transkriptase ist das Schlüsselenzym der Reversen Transkription der Retrotransposons. Sequenzvergleiche der RT-Gene zeigten, dass eine sehr hohe Heterogenität der Gensequenzen im Genom verschiedener Arten existiert (FLAVELL *et al.*; 1992, SCHMIDT *et al.*, 1995; BRANDES *et al.*, 1997). Trotzdem konnten durch Homologieuntersuchungen konservierte Aminosäuredomänen nachgewiesen werden, die sich für die Ableitung von Ty1-*copia*-spezifischen Primern eigneten (FLAVELL *et al.*, 1992; VOYTAS *et al.*, 1992; HIROCHIKA & HIROCHIKA, 1993). Dadurch können durch Polymerasekettenreaktion spezifische Fragmente des RT-Gens aus unterschiedlichen Genomen amplifiziert, isoliert und molekular charakterisiert werden. Durch Fluoreszenz-*in situ*-Untersuchungen konnten Ty1-*copia*-Retrotransposons chromosomal lokalisiert werden. Es zeigte sich, dass Ty1-*copia*-

Retroelemente relativ gleichmässig über die euchromatischen Regionen des Genoms verteilt und in hoher Kopienzahl auf allen Chromosomen vorhanden sind. Weiterhin wurden chromosomale Segmente, in denen die Ty1-*copia*-Retroelemente stark amplifiziert vorliegen, als auch ein Ausschluß der Ty1-*copia*-Retrotransposons aus der pericentromerischen Region und der 18S-5,8S-25S rRNA-Gene beobachtet (SCHMIDT *et al.*, 1995).

Ziel der eigenen Arbeiten war eine cytogenetische Charakterisierung der RT-Gensequenzen der Ty1-*copia*-Retroelemente innerhalb der Gattung *Beta*. Um eine mögliche Existenz von genomspezifischen Sequenzfamilien in den vier Sektionen *Beta*, *Procumbentes*, *Nanae* und *Corollinae* zu prüfen, wurden zunächst Fluoreszenz-*in situ*-Untersuchungen, in denen PCR-Produkte als Sonden eingesetzt wurden, an Hybridlinien der Zuckerrübe durchgeführt. Aus genomischer DNA von *B. vulgaris*, *B. procumbens* oder *B. corolliflora* wurden mit Ty1-*copia*-spezifischen Primern (5'-AARCNTTYGAYAG-3'; 5'-GCRTCRTCNGCRTA-3'; FLAVELL *et al.*, 1992) Retrotransposonsequenzen amplifiziert und mit Hapten-gekoppelten Nukleotiden markiert. Da die DNA-Sonden durch Amplifikation aus genomischer DNA markiert wurden, wurde eine Population divergierter Reverse Transkriptase-Sequenzen mit einer Länge von ungefähr 270 bp, die entweder aus dem Zuckerrüben- bzw. einem Wildrüben genom entstammten, für die FISH-Studien eingesetzt. Chromosomen der monosomen Additionslinie 950039 (2n = 18+1), die ein Wildrübenchromosom aus *B. procumbens* besitzt, und einer amphitriploide Zuckerrübenlinien (2n = 18+9), mit neun aus *B. corolliflora* abstammenden Wildrübenchromosomen, wurden hybridisiert.

Nach der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung war eine disperse Verteilung der aus *B. vulgaris* amplifizierten Retroelemente auf allen 18 Zuckerrübenchromosomen in der monosomen Additionslinie zu beobachten (Abb. 20A). Während die Retroelemente nicht oder in nur geringer Kopienanzahl in pericentromerischen und heterochromatischen Chromosomenregionen nachweisbar waren (Abb. 20A Pfeilkopf), traten in den euchromatischen Bereichen sehr unterschiedliche Signalintensitäten auf. Dies deutet auf unterschiedliche Kopienzahl der Ty1-*copia*-Retroelemente in den Chromosomen. Auch in der Interphase waren die Ty1-*copia*-Retroelemente dispers über den gesamten Kern und nicht im stark DAPI-gefärbten Heterochromatin lokalisiert (Abb. 20B). Durch *in situ*-Hybridisierung mit den aus *B. vulgaris* amplifizierten Retroelementen zeigte ein Chromosom keine Hybridisierungssignale (Abb. 20A Pfeil). Nach gleichzeitiger Hybridisierung der aus *B. procumbens* amplifizierten Retroelemente (Abb. 20C grün, Pfeil) war eine genomspezifische Hybridisierung der Ty1-*copia*-Elemente zu beobachten. Obwohl eine schwache Kreuzhybridisierung auf den 18 Zuckerrübenchromosomen nachweisbar war,

konnte das addierte Wildrübenchromosom eindeutig durch das stärkere Signal der hybridisierenden *B. procumbens*-Fragmente identifiziert werden. Weiterführend wurde auch der Nachweis einer genomspezifischen Hybridisierung mit aus *B. corolliflora* amplifizierten Retroelementen auf den Chromosomen einer amphitriploiden Linie durch *multi-colour* FISH erbracht. Während die 18 Zuckerrübenchromosomen mit dem *B. vulgaris*-spezifischen Satelliten pBV1 markiert wurden (Abb. 20D grün), hybridisierten die differentiell markierten Retroelemente bevorzugt an den neun *B. corolliflora*-Chromosomen (Abb. 20D rot).

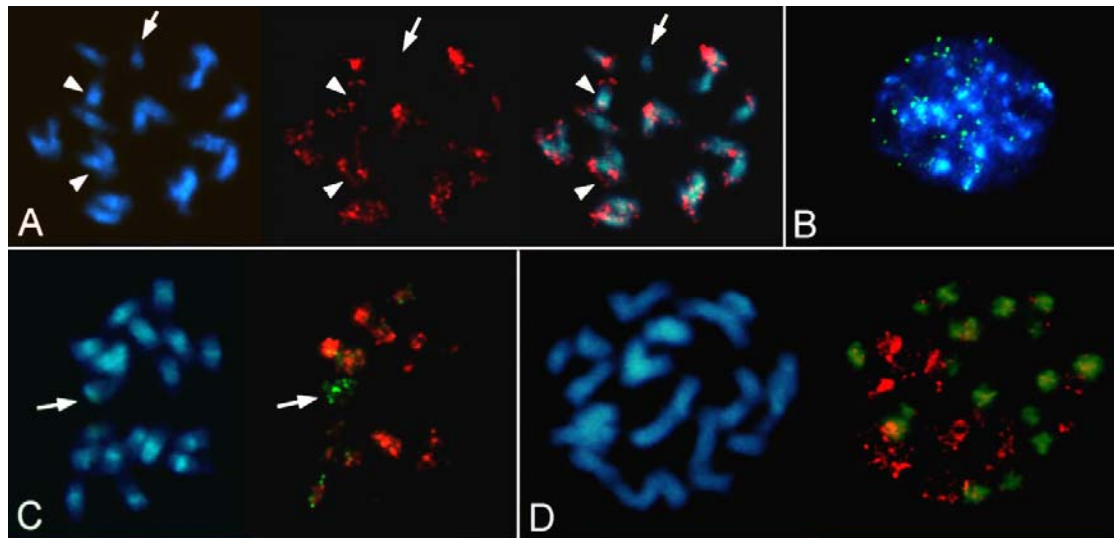


Abb. 20: Vergleichende chromosomale Lokalisierung pflanzlicher LTR-Retrotransposons:

(A-C) Genomspezifische Hybridisierung von Ty1-*cop*ia-Retroelementen an Chromosomen der monosomen Additionslinie von *B. vulgaris* ($2n = 18+1$). (A) Nachweis der Retroelemente aus *B. vulgaris* (rot). (B) Lokalisierung der Retroelemente aus *B. vulgaris* im Interphasekern (grün). (C) Doppelhybridisierung von Ty1-*cop*ia-Elementen aus *B. vulgaris* (rot) und *B. procumbens* (grün). (D) Detektion des *B. vulgaris*-spezifischen BamHI-Satelliten (pBV1, grün) und Ty1-*cop*ia-Retroelementen (rot) aus *B. corolliflora* im Genom einer amphitriploiden Hybridlinie ($2n = 18+9$).

Aufgrund der beobachteten Artspezifität und ihrer dispersen, über alle Chromosomen verteilten Lokalisierung ergab sich die Frage, ob Ty1-*cop*ia-Retrotransposons der hauptverantwortliche Sequenztyp für eine genomspezifische Hybridisierung von Gesamt-DNA (GISH) sein könnte. Darauf basierend wäre denkbar, dass durch Hybridisierung von genomspezifischen, dispers verteilten Retroelementen der Nachweis von Chromosomentranslokationen in Hybridengenomen möglich ist. Im Vergleich zur genomischer DNA wäre durch Einsatz von Retroelementen als DNA-Sonde eine geringere Kreuzhybridisierung zu konservierten Sequenzen (z.B. rRNA oder Telomere) und eine sich daraus ergebenden höheren Genomspezifität zu erwarten. Durch eine detaillierte molekulare

Analyse der Reversen Transkriptase Sequenzen (RT-Sequenzen) von Ty1-*copia*-Retrotransposons der Gattung *Beta* sollte daher überprüft werden, ob genom-spezifische

Retrotransposonfamilien existieren, die ähnlich wie die Gesamt-DNA zur Differenzierung und Analyse von Arthybriden in der FISH eingesetzt werden könnten.

Es wurden insgesamt 39 RT-Sequenzen kloniert und sequenziert. Jeweils neun *Ty1-copia*-Klone der Sektionen *Beta* (Tbv) und der Sektion *Nanae* (Tbn), zehn Klone der Sektion *Procumbentes* (Tbp) und elf Klone der Sektionen *Corollinae* (Tbc) wurden untersucht.

Tab. 7: Klonierte PCR-Produkte nach Amplifikation mit *Ty1-copia*-spezifischen Primern aus genomischer DNA von *B. vulgaris*, *B. procumbens*, *B. corolliflora* und *B. nana*.

Spezies	Bezeichnung	bp Größe	% A+T Gehalt	EMBL GenBank Nr.
<i>B. vulgaris</i>	Tbv-1	266	58,7	Z38076
<i>B. vulgaris</i>	Tbv-3	261	57,9	Z38077
<i>B. vulgaris</i>	Tbv-5	128	65,6	AJ489174
<i>B. vulgaris</i>	Tbv-6	277	55,3	AJ489173
<i>B. vulgaris</i>	Tbv-10	278	56,4	AJ489181
<i>B. vulgaris</i>	Tbv-11	304	46,3	AJ489180
<i>B. vulgaris</i>	Tbv-18	257	64,5	AJ489179
<i>B. vulgaris</i>	Tbv-20	277	63,6	AJ489178
<i>B. vulgaris</i>	Tbv-21	277	63,5	AJ489177
<i>B. vulgaris</i>	Tbv-22	289	61,6	AJ489176
<i>B. vulgaris</i>	Tbv-25	269	56,9	AJ489175
<i>B. procumbens</i>	Tbp-YAC128	210	50,9	AJ249707
<i>B. procumbens</i>	Tbp-2	260	58,9	AJ489188
<i>B. procumbens</i>	Tbp-3	289	60,2	AJ489186
<i>B. procumbens</i>	Tbp-6	274	58,8	AJ489185
<i>B. procumbens</i>	Tbp-7	290	54,9	AJ489184
<i>B. procumbens</i>	Tbp-8	262	61,8	AJ489183
<i>B. procumbens</i>	Tbp-9	270	61,5	AJ489182
<i>B. procumbens</i>	Tbp-10	274	58,8	AJ489193
<i>B. procumbens</i>	Tbp-11	287	46,3	AJ489192
<i>B. procumbens</i>	Tbp-12	150	47,3	AJ489191
<i>B. procumbens</i>	Tbp-13	244	54,5	AJ489190
<i>B. procumbens</i>	Tbp-18	274	58,8	AJ489189
<i>B. procumbens</i>	Tbp-21	267	53,2	AJ489187
<i>B. nana</i>	Tbn-1	259	49,3	AJ489202
<i>B. nana</i>	Tbn-2	256	54,7	AJ489201
<i>B. nana</i>	Tbn-3	246	62,1	AJ489200
<i>B. nana</i>	Tbn-4	281	50,2	AJ489199
<i>B. nana</i>	Tbn-5	264	60,2	AJ489198
<i>B. nana</i>	Tbn-6	282	50,0	AJ489197
<i>B. nana</i>	Tbn-7	308	62,7	AJ489196
<i>B. nana</i>	Tbn-8	266	57,5	AJ489195
<i>B. nana</i>	Tbn-9	266	64,2	AJ489194
<i>B. corollinea</i>	Tbc-3	262	60,9	AJ489206
<i>B. corollinea</i>	Tbc-5	266	50,8	AJ489205
<i>B. corollinea</i>	Tbc-6	233	56,2	AJ489204
<i>B. corollinea</i>	Tbc-8	272	55,1	AJ489203
<i>B. corolliflora</i>	Tbc-12	277	62,5	AJ489213
<i>B. corolliflora</i>	Tbc-13	269	60,2	AJ489212
<i>B. corollinea</i>	Tbc-14	280	60,8	AJ489211
<i>B. corollinea</i>	Tbc-15	277	60,6	AJ489210
<i>B. corollinea</i>	Tbc-16	283	57,2	AJ489209
<i>B. corollinea</i>	Tbc-17	267	65,1	AJ489208
<i>B. corollinea</i>	Tbc-18	291	57,4	AJ489207

Die Sequenzanalyse und die Verrechnung der Sequenzhomologien mit dem Programm PHYLIP ergab eine starke Divergenz der RT-Sequenzen. Auf Nukleinsäureebene zeigten die

Sequenzen eine Homologie zwischen 34,7% bis 99,3%. Dies deutet auf eine große Heterogenität der Ty1-*copia*-Retrotransposons in der Gattung *Beta* hin (Abb. 21.). Sehr homogen ist eine Gruppe der *Nanae*-Klone (Tbn). Die DNA-Sequenzen Tbn-1, Tbn-2, Tbn-3, Tbn-4, Tbn-5 und Tbn-6 weisen einen Homologiegrad von 79,5% bis 88,3% auf. Die Sequenzhomologie zu den weiteren drei Klonen aus der Sektion *Nanae* Tbn-7, Tbn-8 und Tbn-9 beträgt dagegen nur 38,3%, 46,4% bzw. 58,5%.

Die RT-Sequenzen aus *B. procumbens* lassen sich verschiedenen Gruppen zuordnen. Eine *Procumbens*-Gruppe, die ebenfalls relativ homogen ist, umfasst Tbp-3, Tbp-6, Tbp-7, Tbp-10 und Tbp-18 (DNA-Homologie von 98,9% bis 84,8%). Die übrigen Tbp-Klone sind wesentlich heterogener und wurden in der genetischen Distanzanalyse in fast allen Hauptzweigen gefunden. Hierzu gehört auch die Ty1-*copia*-Sequenz aus dem YAC128 (Abb. 21, Pfeil), die relativ dicht zu den *Non-LTR*-Retrotransposons *BNR1-1* und *BNR1-2* und den vier RT-Klone Tbv-20, Tbv-21, Tbv-22 und Tbv-25 aus *B. vulgaris* eingeordnet wurde. Die Homologie zu den *BNR*- und Tbv-Sequenzen sind sehr wahrscheinlich Ursache für die beobachtete schwache Kreuzhybridisierung des YAC128 mit den Zuckerrübenchromosomen (Kap.3.4.3.3.; Abb. 14C; Abb. 15E).

Die aus *B. procumbens* isolierten Klone repräsentieren nur einen kleinen Ausschnitt der Population der Ty1-*copia*-Retrotransposons dieses Genoms. Die heterogene Verteilung der Tbp-Sequenzen im Dendrogramm ist Ausdruck für die Existenz vieler divergierter Subfamilien in *B. procumbens*. Subfamilien von Ty1-*copia*-Retrotransposons liegen in pflanzlichen Genomen unterschiedlich stark amplifiziert vor und können in ihrer Kopienzahl um mehrere Größenordnungen variieren. Aus den starken Signalen des YAC128 in der FISH-Analyse kann geschlossen werden (Kap.3.4.3.3.), dass die aus diesem YAC isolierte und klonierte RT-Sequenz zu einer hochamplifizierten Subfamilie von Ty1-*copia*-Retrotransposons gehört, die relativ spezifisch für das *B. procumbens*-Genom ist. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Ty1-*copia*-Elemente, die über das gesamte Wildrübenchromosom verteilt sind, für das Hybridisierungsmuster des YAC128 verantwortlich waren.

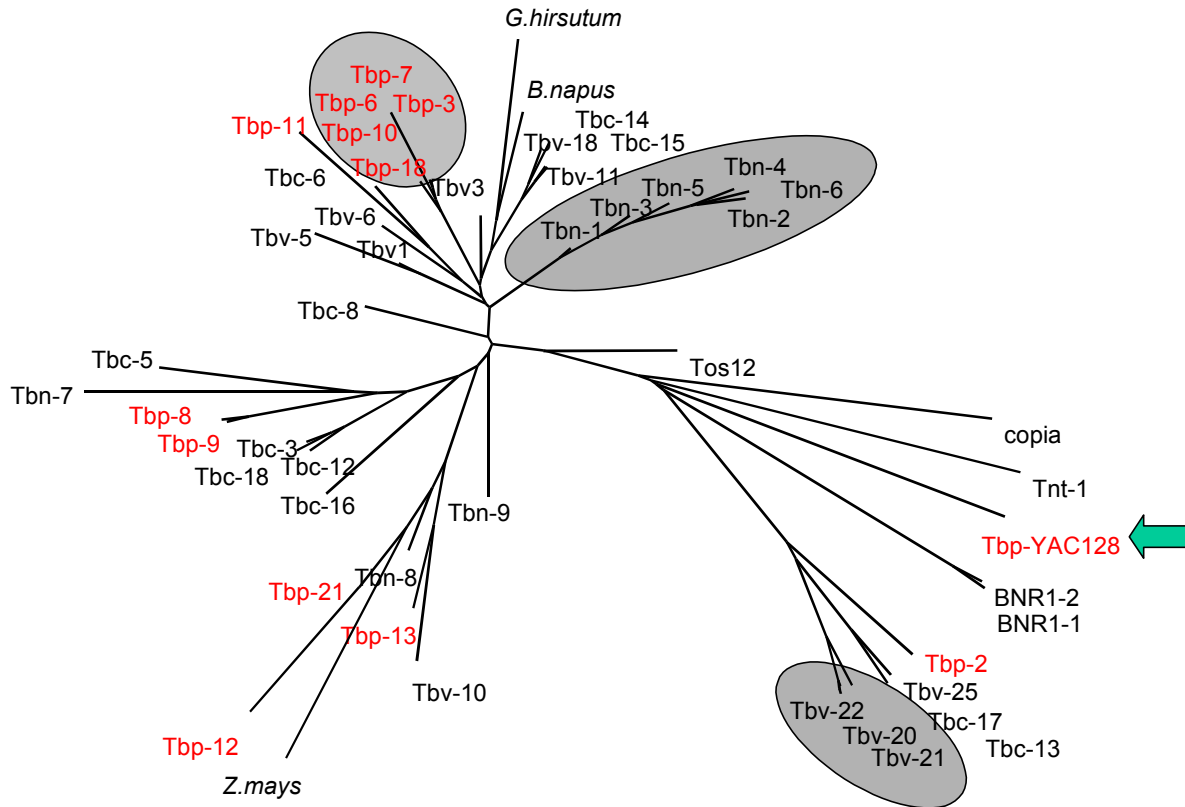


Abb. 21: Darstellung der Sequenzdivergenz von Retroelementen nach Verrechnung der Sequenzheterogenität mit dem Programm PHYLIP. Rot gekennzeichnet sind die RT-Sequenzen von *B. procumbens*. Gruppen sehr nah verwandter Elemente aus *B. nana*, *B. vulgaris* und *B. procumbens* sind grau unterlegt. Die Ty1-*copia*-Sequenz aus dem YAC128 ist durch einen Pfeil markiert.

Ty1-*copia* Retrotransposons:

Gossypium hirsutum (AC: M94471); *Brassica napus* (AC: M94491); *Zea mays* (AC: M94481); *Drosophila melanogaster* (*copia*; AC: X02599); *Oryza sativa* (Tos12; AC: D85870); *Nicotiana tabacum* (Tnt1; AC: X13777); *B. vulgaris* (Tbv1; AC: Z38076); *B. vulgaris* (Tbv3; AC: Z38077); *B. procumbens* (Tbp-YAC128; AC: AJ249707).

Non-LTR-Retrotransposons:

B. vulgaris (BNR1-1; AC: Z38073); *B. vulgaris* (BNR1-2; AC: Z38074).

Die RT-Sequenzen der drei Sektionen *Beta*, *Procumbentes* und *Corollinae* bilden keine scharf abgegrenzten, individuellen Subfamilien, die spezifisch und repräsentativ für eine Sektion sind. Für eine genomspezifische Hybridisierung geeignet erscheint nur die relativ homogene Gruppe von Tbp-3, Tbp-6, Tbp-7, Tbp-10 und Tbp-18. Um die Genomspezifität einzelner Klone zu überprüfen wurde eine Hybridisierung von genomischer DNA der drei Sektionen an klonierte Ty1-*copia*-Fragmente des RT-Gens durchgeführt. Für den *Southern*-Blot wurden jeweils 12 Klone aus *B. vulgaris*, *B. procumbens* und *B. corolliflora* durch PCR mit M13-Primersequenzen amplifiziert und im Gel aufgetrennt. Danach erfolgte der *Southern*-Transfer

und die Hybridisierung mit der radioaktiv markierter genomischer DNA aus *B. vulgaris*, *B. procumbens* und *B. corolliflora* (Abb. 22).

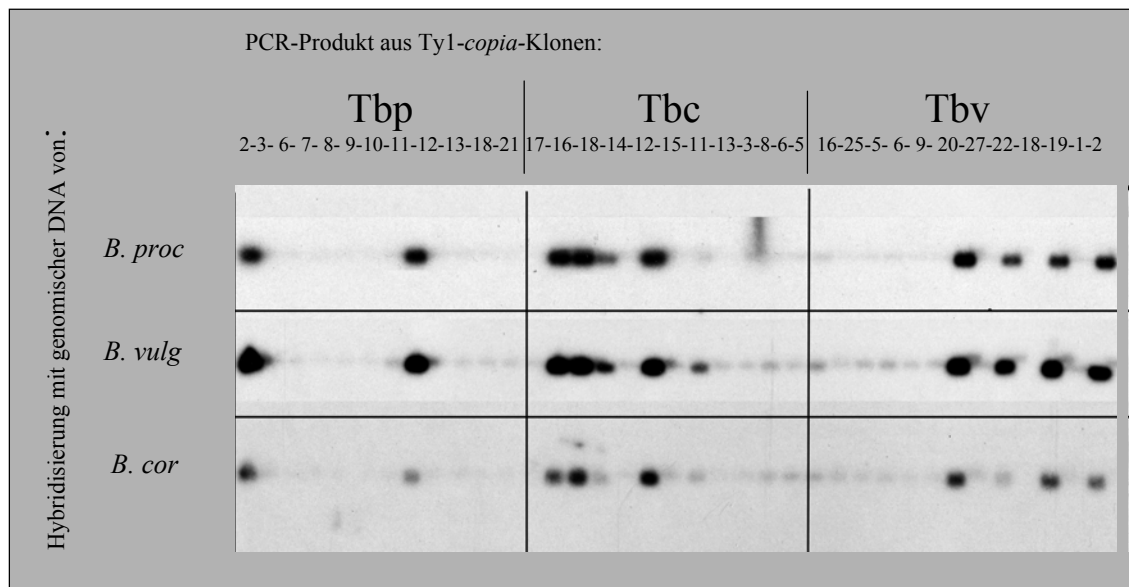


Abb. 22: Hybridisierung von genomischer DNA aus *B. vulgaris*, *B. procumbens* und *B. corolliflora* mit DNA klonierter Fragmente (Tbp aus *B. procumbens*, Tbc aus *B. corolliflora* und Tbv aus *B. vulgaris*) der Reverse Transkriptase der Ty1-copia- Retroelemente. Auftrennung der Fragmente erfolgte in einem 1,3%igen Agarosegel.

Eine genomspezifische Hybridisierung einzelner Klone wurde nicht nachgewiesen.

Beobachtet wurde, dass die genomische DNA aus den drei Arten unterschiedlich stark an die Fragmente bindet. Dies läßt Rückschlüsse auf die Abundanz der klonierten Sequenzen im *Beta*-Genom zu. Homologe Sequenzen, die in hoher Kopienzahl in allen *Beta* Genom vorliegen, sind Tbp-2, Tbp-13, Tbc-16, Tbc-18, Tbc-15 und Tbv-1, Tbv-6, Tbv-18, Tbv-27. (Abb. 22). Ein Vergleich der Positionen dieser in hoher Kopienzahl vorhandenen Sequenzen in der bildlichen Darstellung der Sequenzdivergenz in Abb. 21 läßt keinen Zusammenhang zwischen Zugehörigkeit zu einer spezifischen Subfamilie und Kopienanzahl im Genom vermuten.

Durch FISH war eine genomspezifische Hybridisierung einer gemischten Population divergierter Fragmente des Reversen Transkriptase-Gensequenz im Genom von Hybridlinien eindeutig nachweisbar (vgl. Abb. 20). Da diese Genomspezifität nicht durch Hybridisierung von genomischer DNA an die isolierten RT-Sequenzen bestätigt werden konnte (Abb. 22), ist zu vermuten, dass komplexe artspezifische Subfamilien der Ty1-copia- Retrotransposonsequenzen vorliegen. Durch Hybridisierung eines Sequenzengemisches mit Klonen, die eine hohe Homologie zeigen (z.B. Gemisch bestehend aus Tbp-3, Tbp-6, Tbp-7,

Tbp-10 und Tbp-18), an genomische DNA der Arten könnte diese Vermutung bestätigen. Aus zeitlichen Gründen konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht mehr durchgeführt werden.

3.5.2. Chromosomale Lokalisierung von Ty3-gypsy ähnlichen Retroelementen in *B. procumbens* und *Cicer arietum*

Neben den Ty1-*copia*-Retrotransposons wurde die zweite Gruppe der LTR-Retrotransposons, die Ty3-gypsy-ähnlichen Retroelemente analysiert. Sie unterscheiden sich von den Ty1-*copia*-Retrotransposons in der Anordnung der Integrase- und der Reversen Transkriptase-Gensequenzen innerhalb der internen Domäne (Abb. 1). Ty3-gypsy-Elemente können zusätzlich ein *env*-Gen enthalten, das Ähnlichkeiten mit einem von Retroviren bekannten Hüllprotein besitzt. Ty3-gypsy-Retroelemente scheinen daher enger verwandt mit Retroviren zu sein. Hochrepetitive Ty3-gypsy-ähnliche Retrotransposons wurden unter anderem in *Z. mays* (*Cinful-1*; SANMIQUEL & BENNETZEN, 1998) oder in *Lilium henryi* (*dell*; SMYTH *et al.*, 1989) molekular charakterisiert. Chromosomal lokalisiert wurden bisher nur einige der isolierten Ty3-gypsy-Retroelemente. In pericentromerischer Region wurde *Athila* aus *A. thaliana* lokalisiert. *Cyclops-2* aus *Pisum sativum* konnte dagegen dispers im Genom verteilt nachgewiesen werden (nach KUMAR & BENNETZEN, 1999).

In Zusammenarbeit mit Dr. I. GALASSO (Germplasm Institute Bari, CNR, Italien) wurde aus dem Genom der Wildrübe *B. procumbens* das erste Ty3-gypsy-ähnliche Retroelement (pBP10) in der Gattung *Beta* isoliert und molekular charakterisiert (GINDULLIS *et al.*, 2001). Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung an meiotischen Wildrübenchromosomen haben gezeigt, dass pBP10 in hoher Kopienzahl im pericentromerischen Heterochromatin vorliegt (vgl. Abb. 10E+G). In niedriger Kopienzahl sind Ty3-gypsy-ähnliche Retroelemente auf allen Chromosomen detektierbar (Abb. 23A).

Bemerkenswert war, dass die Ty3-gypsy-Retroelemente in den centromerischen Regionen chromosomale Polymorphismen aufwiesen, die sich zu drei Mustern zusammenfassen lassen:

- Es trat kein detektierbares Signal innerhalb der zentralen Einschnürung auf, während in den flankierenden, heterochromatischen Blöcken eine hohe Kopienzahl des Retroelementes nachgewiesen wurden (Abb. 23B Pfeil).
- Innerhalb der zentralen Einschnürung war das Retrotransposon hoch amplifiziert, während in den angrenzenden heterochromatischen Blöcken nur kleine Cluster auftraten (Abb. 23B Pfeilkopf).
- Keine detektierbare Amplifikation der Ty3-gypsy-ähnlichen Sequenzen in den centromerischen Regionen.

Durch die *in situ*-Hybridisierung an Pachytänchromosomen war es möglich, die Verteilung der Ty3-*gypsy*-ähnlichen Retrotransposons im Genom mit hoher Auflösung darzustellen. Dadurch konnten hochabundante pericentromerische und kleine disperse Repeatblöcke sowie eine variable Organisation der Elemente im centromernahen Bereich simultan nachgewiesen werden.

Um mögliche artübergreifende Muster der chromosomalen Lokalisierung der Ty3-*gypsy* Retrotransposons im pflanzlichen Genom zu ermitteln, wurden weitere Studien an der Kichererbse (*Cicer arietum*, $2n = 16$, Genomgröße: 738 Mbp) durchgeführt, die ein ähnlich großes Genom wie *B. vulgaris* besitzt. In Kooperation mit Dr. C. STAGINNUS aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. DR. KAHL (Plant Molecular Biology, Universität Frankfurt) wurde eine Plasmidbank des *Cicer*-Genomes, die durch *shot gun*-Klonierung von *EcoRI*-Fragmenten hergestellt worden war, mit Gesamt-DNA auf hochrepetitive Genomkomponenten durchsucht. Zwei nicht-homologe Ty3-*gypsy*-Retrotransposons ähnliche Sequenzen *CaRep1* (2140 bp) und *CaRep2* (950 bp) konnten als prominente Elemente der hochrepetitiven DNA in *C. arietum* identifiziert und charakterisiert werden (STAGINNUS *et al.*, 1999). Die beiden AT-reichen Sequenzen wiesen auf DNA- und Aminosäureebene Homologie zu den Genen für Protease und Reverse Transkriptase von *del1* (*Lilium henryi*, SMYTH *et al.*, 1989) auf.

Die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung von *CaRep1*- und *CaRep2*-Sonden an mitotischen Chromosomen von *C. arietum* zeigte über alle Chromosomen verteilte Hybridisierungsmuster. Starke Hybridisierungssignale wurden in den DAPI-positiven Regionen aller Chromosomen beobachtet (Abb. 21G+H). Die Ty3-*gypsy*-ähnlichen Retroelemente waren hoch abundant im centromernahen Heterochromatin und wurden aus der zentralen, centromerischen Region ausgeschlossen (Abb. 23C Pfeil). Das Retroelement *CaRep1* war auch im Euchromatin, d.h. den schwach DAPI-gefärbter chromosomalen Regionen, nachweisbar (Abb. 23D Pfeile). Das Retroelement *CaRep2* hingegen war vor allem im Heterochromatin lokalisiert (Abb. 23C).

Die *in situ*-Hybridisierungsmuster von Ty3-*gypsy*-ähnlichen Retroelementen an Chromosomen von *B. procumbens* und *C. arietum* zeigten in beiden Genomen eine hohe Abundanz der Repeats im centromernahen Heterochromatin. Während im Genom von *B. procumbens* die Ty3-*gypsy*-ähnlichen Retroelemente aber z.T. innerhalb der zentralen chromosomalen Einschnürung lokalisiert sind, zeigen die Ergebnisse an, dass sie in *C. arietum* aus centromerischen Regionen ausgeschlossen sind. Desweiteren weisen schwache Hybridisierungssignale im Euchromatin darauf hin, dass in beiden Arten weitere

Retroelementfamilien vom Ty3-*gypsy*-Typ in niedriger Kopienzahl in euchromatischen Regionen lokalisiert sind. Allerdings kann auch eine geringe Kreuzhybridisierung der DNA-Sonden mit ähnlichen im Euchromatin lokalisierten Sequenzabschnitten nicht auszuschließen.

3.5.3. Verteilung von *Non-LTR* Retrotransposons (LINEs) im *Beta*-Genom

Zu den nicht viralen oder *Non-LTR*-Retrotransposons gehören LINEs (*long interspersed elements*). Die LINE sind in Säugergenomen weit verbreitet. Bisher charakterisierte LINE-Familien aus Pflanzen sind z.B. *Cin4* aus *Zea mays* oder *del2* aus *Lilium speciosum* (nach BENNETZEN, 1996)

Mit degenerierten Primersequenzen, die aus dem Gen der Reversen Transkriptase von *Cin4* und *del2* abgeleitet wurden, wurde die Sequenzfamilie *BNR1* aus dem Genom von *Beta vulgaris* charakterisiert (SCHMIDT *et al.*, 1995). Nach Homologievergleichen wurden aus DNA-Regionen des RT-Gens, die für konservierte Aminosäuren kodieren, LINE-spezifische Primer für einen PCR-Assay abgeleitet (KUBIS *et al.*, 1998). Diese Primer wurden als BEL1 (5'-RVNRANTTYCGNCCNATHTC-3') und BEL2 (5'-TCYGTCCCCCTRGGRRACAG-3') bezeichnet. Durch den spezifischen PCR-Assay wurde die Amplifikation und molekulare Analyse von LINE-Fragmenten (410 bp) aus genomischer DNA verschiedener Pflanzenarten möglich. Die Sequenzhomologie auf Nukleinsäureebene zwischen den analysierten LINEs im Genom von *B. vulgaris*, *B. lomatogona* und *B. nana* variiert stark. Die Retroelemente *BvLi3* (*B. vulgaris*) und *BLLi2* (*B. lomatogona*) sind beispielsweise auf DNA-Ebene nur zu 43,2% homolog.

Eine chromosomale Lokalisierung der isolierten LINE-Fragmente wurde im Genom von *B. vulgaris* und *B. lomatogona* durchgeführt. Aufgrund der großen Variabilität der klonierten Sequenzen einer Art wurden als Sonden für die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung jeweils 3-6 markierte Klone eingesetzt. Kopien der Retroelemente *BNR1-6* wurden auf allen 18 Chromosomen von *B. vulgaris* detektiert (Abb. 23E). Signale auf beiden Chromatiden waren in interkalaren oder terminalen Chromosomenregionen nachweisbar. Auf allen Chromosomen von *B. lomatogona* wurden auch Kopien der Retroelemente *BLLi1-3* nachgewiesen. Sie waren in terminalen euchromatischen Chromosomenregionen lokalisiert (Abb. 23F). Sehr schwache und starke Hybridisierungssignale innerhalb einer Art weisen auf regionale Unterschiede der Kopienzahl und eine Clusterung der LINE auf den Chromosomen hin Um Hinweise auf die Artspezifität der LINEs zu erhalten, wurden die aus *B. lomatogona* isolierten Klone *BLLi1-3* an Chromosomen von *B. vulgaris* hybridisiert. Unter Standardbedingungen (Kap.4.2.6.) war zunächst keine spezifische Hybridisierung an den Zuckerrübenchromosomen zu beobachten. Eine erfolgreiche Hybridisierung wurde erst nach Reduktion der Stringenz der

Waschlösungen von 78% auf 72% nachgewiesen. Kopien der Retroelemente *BLL1-3* wurden in telomerischen und vereinzelt (d.h. auf 4-6 Chromosomen) in interkalaren Chromosomenregionen detektiert (Abb. 23G).

Um auch für LINEs Hinweise auf generelle Merkmale der chromosomalen Verteilung zu erhalten, wurde in vergleichenden Untersuchungen das aus *Antirrhinum majus* ($2n = 16$) isolierte Retrotransposon *AmLi* auf Chromosomen von *A. majus* lokalisiert. Auf 4-6 Chromosomen lassen sich LINEs in niedriger Kopienzahl in interkalaren Regionen detektieren. 6-8 Chromosomen zeigen starke Hybridisierungssignale. Auf einigen Chromosomen sind eng benachbart mehrere Loci von *AmLi* zu erkennen. Die Hybridisierungsorte liegen im Euchromatin eng benachbart zum pericentromerischen Heterochromatin.

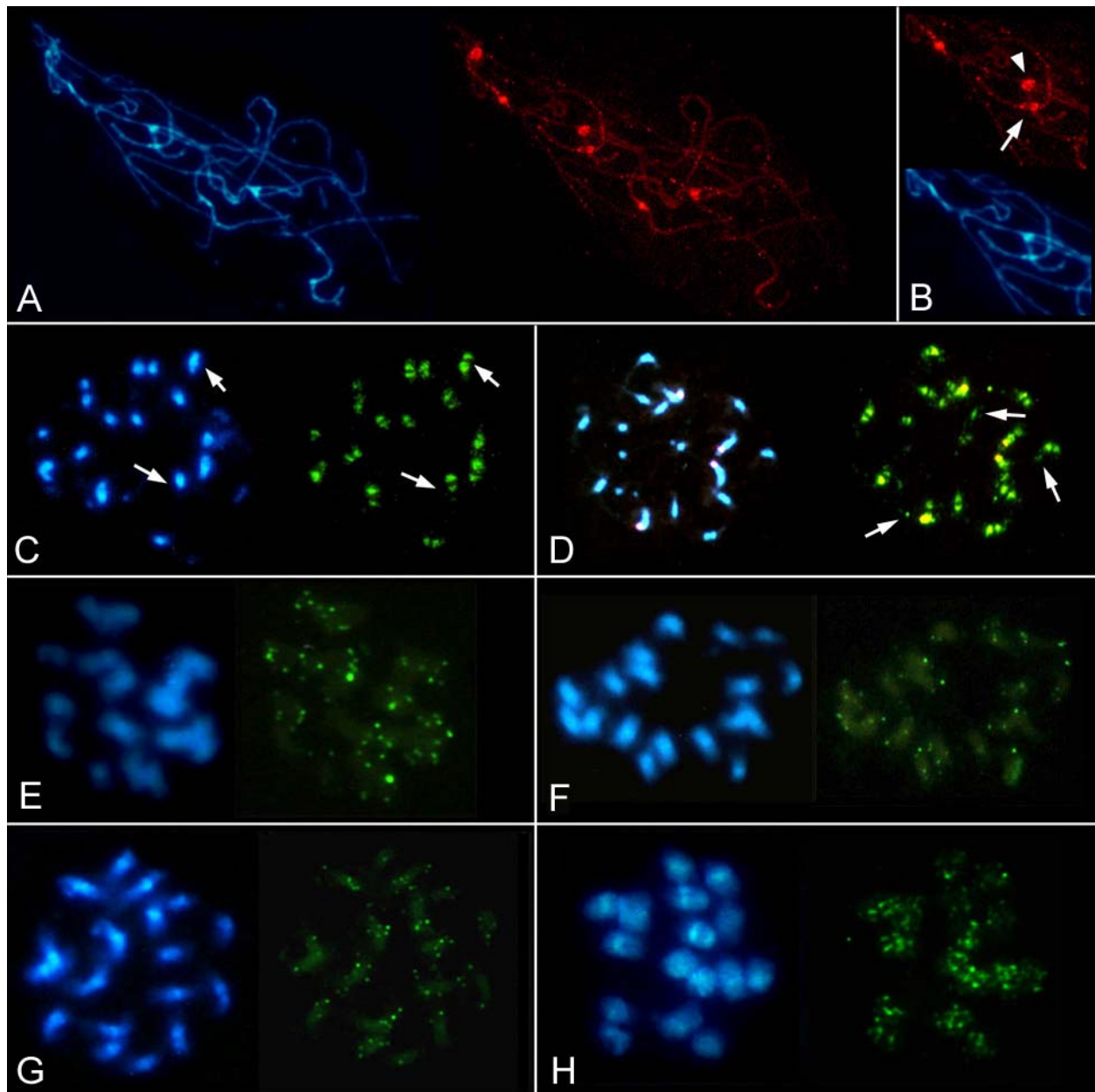


Abb. 23: Vergleichende chromosomale Lokalisierung pflanzlicher LTR-Retrotransposons und Non-LTR-Retrotransposons:

(A-B) Detektion des Ty3-gypsy-ähnlichen Retroelements pBP10 in *B. procumbens*. Disperse Hybridisierung auf allen Chromosomen und starke Signale in pericentromerischen Regionen. Pfeile (B) weisen auf chromosomale Polymorphismen der Hybridisierungsmuster.

(C-D) Nachweis der Ty3-gypsy-ähnlichen Elemente *CaRep2* (C) und *CaRep1* (D) im Heterochromatin von *Cicer arietum*. Kein Signal war innerhalb der centromerischen Region detektierbar (C Pfeile). Das Retroelement *CaRep1* war auch im Euchromatin ausgebreitet (D Pfeile).

(E-H) Lokalisierung von Non-LTR-Retrotransposons (LINEs) in *B. vulgaris* (E: *BNR1-6* + G: *BLLi1-3*), *B. lomatogona* (F: *BLLi1-3*) und *Antirrhinum majus* (H: *AmLi*). Die LINEs wurden in allen Arten in terminal euchromatischen Chromosomenregionen detektiert. Auf Chromosomen von *B. vulgaris* (E+G) konnten vereinzelt auch Signale im interkalaren Chromosomenbereich nachgewiesen werden. In *A. majus* (H) wurden chromosomenspezifische Hybridisierungsmuster, die durch hohe Kopienzahlen der LINEs in interkalaren Regionen verursacht wurden, beobachtet.

Alle Hybridisierungsmuster zeigen eine starke Übereinstimmung. Die LINEs aus den drei Arten *B. vulgaris*, *B. lomatogona* und *A. majus* sind auf allen Chromosomen der jeweiligen Art nachweisbar. Sie können in interkalaren oder terminalen euchromatischen Chromosomenregionen lokalisiert sein. Die differierenden Signalintensitäten weisen auf unterschiedliche Kopienzahlen auf den Chromosomen hin. Die LINEs aus *A. majus* bilden im Vergleich zu den LINEs der *Beta*-Arten größere Cluster in interkalaren Chromosomenregionen. Die Unterschiede der Signalintensitäten, und damit der Kopienanzahl der LINEs, sind auf den Chromosomen von *A. majus* deutlich zu erkennen.

Durch die vergleichende Lokalisierung von Non-LTR- und LTR-Retrotransposons konnten Prinzipien der Verteilung disperser DNA-Sequenzfamilien im *Beta*-Genom aufgezeigt werden. Durch die ergänzenden FISH-Studien in weiteren pflanzlichen Arten wurden die Befunde bestätigt und Hinweise auf grundlegende strukturelle Merkmale erhalten.

4. Diskussion

4.1. Einsatz der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung in der pflanzlichen Genomanalyse: Möglichkeiten und Grenzen

Die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) ist ein schnelles und direktes Verfahren zum optischen Nachweis von Nukleinsäuresequenzen im Nukleus. FISH-Verfahren können eingesetzt werden, um die Struktur von Chromosomen und Genomen zu analysieren und physikalische Chromosomenkarten zu erstellen. Die Leistungsfähigkeit dieser Methode und ihre Einsatzmöglichkeiten in der Genomanalyse werden entscheidend durch Sensitivität und Auflösungsvermögen des Verfahrens bestimmt. Die Detektion von unikalen DNA-Markern oder Gensonden auf Chromosomen erfordert eine möglichst hohe Sensitivität der *in situ*-Hybridisierung. Weiterhin sind insbesondere für einen visuellen Nachweis von eng benachbarten DNA-Sequenzen hochauflösende Verfahren der *in situ*-Hybridisierung notwendig.

4.1.1. Einsatz der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung zur Genlokalisierung und physikalische Kartierung

Durch Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) wurden in pflanzlichen Genomen zunächst repetitive Sequenzen chromosomal lokalisiert (SCHWARZACHER *et al.*, 1988; LEITCH & HESLOP-HARRISON, 1993; HARRISON & HESLOP-HARRISON, 1995; VERSHININ *et al.*, 1995; SCHMIDT & HESLOP-HARRISON, 1996). Hochrepetitive Satelliten- und Minisatelliten-DNA wie auch die Gene der ribosomalen RNAs, die zu den mittelrepetitiven Genomkomponenten gehören, wurden im Genom von *Beta vulgaris* durch FISH nachgewiesen (SCHMIDT, 1998; SCHMIDT *et al.*, 1990; 1991; 1994; KUBIS *et al.*, 1997). Für die physikalische Kartierung von DNA-Markern und Gensequenzen auf Chromosomen, ist aber die chromosomale Lokalisierung von unikalen DNA-Sequenzen unentbehrlich. Allerdings können unikale DNA-Sequenzen zumeist nur durch FISH-Signale mit schwacher Fluoreszenzintensität detektiert werden (PETERSON *et al.*, 1999; TEN HOOPEN *et al.*, 1996). Für die Beobachtung und bildliche Darstellung der FISH-Ergebnisse ist daher der Einsatz hochempfindlicher optischer Systeme der Fluoreszenzmikroskopie, wie auch entsprechend sensitive und hochauflösende Bildaufnahme- und Imageverarbeitungsverfahren grundlegend. Ferner waren für die eigenen Arbeiten spezifisch bindende DNA-Sonden, effiziente Markierungstechniken und qualitativ hochwertige, d.h. cytoplasmafreien Chromosomenpräparate mit einem hohem Metaphaseindex von mind. 0,5 % erforderlich. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde

insbesondere durch die Optimierung der Chromosomenpräparation (d.h. Minimierung von Cytoplasmaresten und Erhöhung des Metaphaseindex) eine effektive spezifische Hybridisierung an die Zielsequenz bei minimaler unspezifischer Bindung erreicht. Dies ermöglichte die chromosomale Lokalisierung einzelner YAC-Insertionen, die simultane Detektion und Positionierung zweier YACs sowie den erstmaligen Nachweis eines unikalen Gens, das Nematodenresistenzgen *HsI^{pro-1}* im Genom von *B. vulgaris* (DESEL *et al.*, 2001).

Die Insertionen einzelner YACs oder BACs wurden im pflanzlichen Genomen zuvor schon mehrfach durch FISH-Studien chromosomal lokalisiert (JIANG *et al.*, 1995; GOMEZ *et al.*, 1997; ZWICK *et al.*, 1998; FUCHS *et al.*, 1996b; PETERSON *et al.*, 1999). Über den Nachweis von zwei oder mehr unikalen Sequenzen auf pflanzlichen Chromosomen durch *multi-colour* FISH wird dagegen seltener und nur in neueren Literaturdaten berichtet (FRANSZ *et al.*, 2000, LYSAK *et al.*, 2001; CHENG *et al.*, 2001a). Der simultane Nachweis von YAC-Klonen erlaubt eine Bestimmung der relativen Position der YACs und die chromosomale Orientierung von YAC-Contigs (FRANSZ *et al.*, 2000, DESEL *et al.*, 2001). Durch die Etablierung der Doppelhybridisierung zweier YACs auf der Wildrüben-Translokation der Zuckerrübenlinie A906001 wurde durch die eigenen Arbeiten die Voraussetzung für die physikalische Kartierung und Strukturanalyse von chromosomalen Abschnitten durch *in situ*-Hybridisierung in der Gattung *Beta* geschaffen. Weiterführend konnten die methodischen Verbesserungen der Chromosomenpräparation bereits durch D. DECHYEVA (pers. Mitteilung) auch zur chromosomalen Lokalisierung von BAC-Klonen auf *Beta*-Chromosomen erfolgreich eingesetzt werden.

Nach der erfolgreichen Detektion von YAC-Klonen, deren Insertionen mehrere hundert Kilobasen genomischer DNA enthalten, bestand eine weitere Herausforderung in der Lokalisierung unikalere Gensequenzen von nur 1-2 kb. Da die Fluoreszenzintensität der Hybridisierungssignale proportional zur Gesamtlänge der chromosomalen Zielsequenz ist, ist die Detektion kurzer Zielsequenzen sehr schwierig. Die Spezifität schwacher Signale ist nur gewährleistet, wenn unspezifische Hintergrundsignale nahezu vollständig eliminiert sind und ein Nachweis der Hybridisierungssignale an beiden Schwesterchromatiden sowie auf identischer Position der homologen Chromosomen erfolgt. In der Gattung *Beta* wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit das Nematodenresistenzgen *HsI^{pro-1}* detektiert. Die *HsI^{pro-1}*-Sonde war für den erstmaligen Nachweis einer kurzen unikalen Gensequenz im *Beta* Genom besonders geeignet, da die ungefähre chromosomale Position des *HsI^{pro-1}*-Gens durch die vorangehende Lokalisierung des YAC120, der die *HsI^{pro-1}*-Gensequenz

enthält, bekannt war. Durch Anzahl und Position der Hybridisierungssignale war es daher möglich die Spezifität der Hybridisierung zu überprüfen. Als Gensonde wurde ein Fragment des klonierten Nematodenresistenzgens *HsI^{pro-1}* mit einer Sequenzlänge von 684 bp eingesetzt. Vergleichbare DNA-Sonden unikalere Gensequenzen mit Sequenzlängen von 1,4 kb und 1,29 kb wurden von FRANSZ *et al.* (1996b), TEN HOOPEN *et al.* (1996), MOSCONE *et al.* (1996) und OHMIDO *et al.* (1998) in Petunie und Reis durch *in situ*-Hybridisierung nachgewiesen. Indess zählt die in *B. vulgaris* hybridisierte Gensonde zu den bislang kürzesten unikalere DNA-Sequenzen, die in der pflanzlichen Genomanalyse erfolgreich eingesetzt wurden.

Die Möglichkeit des direkten optischen Nachweises von unikalere DNA-Sequenzen auf den Chromosomen von *B. vulgaris* eröffnet vielfältige Anwendungsmöglichkeiten in der Genomanalyse der Gattung *Beta*. Weiterführende Projekte und Verknüpfungen zu aktuellen Forschungsarbeiten sind beispielsweise:

- Um die physikalische Feinkartierung der Translokation der Zuckerrübenlinie A906001 zu unterstützen, sollten durch die chromosomale Lokalisierung der 14b-Gensequenz oder weiterer translokationsspezifischer YAC-Klone auf der Translokation die molekularen Daten ergänzt werden (D. CAI, pers. Mitteilung; A. SCHMIDT pers. Mitteilung; KLEINE *et al.*, 1995).
- Weiterhin kann das etablierte Verfahren der chromosomalen Lokalisierung von BAC-Klonen für die Analyse von centromerassoziierter und *B. procumbens*-spezifischer Sequenzen aus der BAC-Bibliothek der Fragmentadditionslinie PRO1 eingesetzt werden (GINDULLIS *et al.*, 2001a, DECHYEVA *et al.*, eingereicht). Hierdurch ist ein wesentlicher Beitrag zur Analyse der Centromerregion der Linie PRO1 zu erwarten.

Bemerkenswert für das hier etablierte FISH-Verfahren zum Nachweis von unikalere Sequenzen ist ferner, dass auf eine Verstärkung der Signale durch sekundär und tertiär bindende Antikörper verzichtet werden konnte. Auch war eine Kompetition oder Vorhybridisierung der DNA-Sonde mit *blocking*-DNA (z.B. C₀t-1-DNA), die ubiquitär im Genom vorkommenden Sequenzen enthält, zur Vermeidung von unspezifischen Hybridisierungssignalen nicht erforderlich. Entscheidend für das Erreichen einer hohen Sensitivität der FISH war der Einsatz von qualitativ hochwertigen Chromosomenpräparationen, die eine effektive Hybridisierung und einen minimalen Anteil an Hintergrundsignalen gewährleisteten.

Besonders effiziente Nachweisverfahren, wie der Einsatz von Tyramidmolekülen (*tyramide FISH*: Tyr-FISH), können zu einer weiteren Steigerung der Sensitivität beitragen (RAAP *et al.*, 1995; KHRUSTALEVA & KIK, 2001). Dazu werden Tyramidderivaten, die mit einem Reporter (meist einem Fluorochrom) gekoppelt sind, enzymatisch aktiviert und an der Sonde lokal akkumuliert. Eine hohe Zahl von aktivierten Tyramid-gekoppelten Fluorochrommolekülen führt zu einer enormen Signalverstärkung und einer hohen Sensitivität des Nachweises. In weiterführenden Arbeiten sollte dieses Verfahren eingesetzt und getestet werden. Es ist anzunehmen, dass die Sensitivität der FISH-Analysen an Chromosomen der Gattung *Beta* dadurch weiter gesteigert wird. Da die Amplifikation von Hybridisierungssignalen aber auch immer eine Verstärkung von unspezifischem Hintergrund verursacht, wird der Erfolg des Tyramid-Verfahrens im Wesentlichen ebenfalls durch den Einsatz von qualitativ hochwertigen und cytoplasmafreien Chromosomenpräparationen beeinflusst werden.

4.1.2. Das Auflösungsvermögen der FISH-Verfahren

Für viele Fragestellungen der pflanzlichen Genomanalyse ist die relative Position und physikalische Distanz zwischen eng benachbarten DNA-Sequenzen von großer Bedeutung. Die Steigerung des Auflösungsvermögens (d.i. eine Verringerung des detektierbaren Abstands zwischen zwei Zielsequenzen) der *in situ*-Hybridisierung an Chromosomen der Gattung *Beta*, war daher ein weiteres Ziel der methodischen Entwicklung.

Bei Metaphasechromosomen ist eine Differenzierung von DNA-Sequenzen nicht möglich, die weniger als 1 Mb trennen (HEISKANEN *et al.*, 1996). Für eine physikalische Feinkartierung der Chromosomen der Gattung *Beta* werden wesentlich höhere Auflösungen benötigt. Es war daher notwendig, FISH-Protokolle in Verbindung mit Präparationen von dekondensierter DNA für die Genomanalyse der Gattung *Beta* zu etablieren. Durch Verwendung weniger stark kondensierter Prometaphasechromosomen wurde nur eine geringe Steigerung der Auflösung erreicht. Auf dekondensierten meiotischen Chromosomen wurden dagegen Abstände von 300-500 kb detektiert (RAAP *et al.*, 1996). An Pachytänchromosomen aus Tomate konnten DNA-Sequenzen mit einer Distanz von 1,2 Mb in heterochromatischen Chromosomenregionen und von 120 kb in euchromatischen Bereichen detektiert werden (DE JONG *et al.*, 1999). An frühen Pachytänchromosomen zeigten CHENG *et al.* (2001a), dass es möglich ist, zwei BAC-Klone im Abstand von 40 kb separat zu lokalisieren.

In den eigenen Ergebnissen war nach einer Doppelhybridisierung von YAC120 und YAC128 an meiotischen Chromosomen zwischen beiden Zielregionen ein Segment ohne Hybridisierungssignal detektierbar. Molekulare Untersuchungen bestätigten, dass beide YACs durch einen chromosomalen DNA-Abschnitt von nur 200 kb getrennt werden (D. CAI, pers. Mitteilung). Der Nachweis dieses DNA-Abschnittes von 200 kb durch *in situ*-Hybridisierung bestätigt, dass auch an den meiotischen Chromosomen von *B. vulgaris* eine gegenüber der FISH an Metaphasechromosomen verbesserte Auflösung der Hybridisierungssignale erreicht werden konnte. Durch Hybridisierung an dekondensiertes Chromatin von Interphasekernen aus humanen Zellen wurde das Auflösungsvermögen weiter gesteigert (HEISKANEN *et al.*, 1996). Problem der Hybridisierung an Interphasekernen ist die dreidimensionale Anordnung der Chromosomen. Der Nachweis von größeren Distanzen ist nur durch Einsatz der *Laser Scanning*-Mikroskopie möglich (MONTIJN *et al.*, 1994).

Das Auflösungsvermögen der FISH im pflanzlichen Genom wurde durch den Einsatz von Chromatinfasern nachhaltig gesteigert (FRANZ *et al.*, 1996a). In ersten Analysen mit dem sogenannten *fbre*-FISH-Verfahren wurde eine Auflösung von 10-20 kb erreicht (HENG *et al.*, 1992). Durch FLORIJN *et al.* (1996) wurde eine chromosomale Distanz von 200 bp durch *fbre*-FISH nachgewiesen. Die optische Analyse der Hybridisierungssignale an Chromatinfasern erlaubt die Bestimmung von Repeatlängen und die Detektion von überlappenden Regionen sowie die Unterbrechungen von Sequenzfolgen (HENG *et al.*, 1992, FRANZ *et al.*, 1996a; JACKSON *et al.*, 2000; CHENG *et al.*, 2001a).

4.1.3. Einsatz der *fbre*-FISH in der Genomanalyse der *Beta*-Arten

Zur Etablierung des hochauflösenden *fbre*-FISH-Verfahrens in der Genomanalyse der Gattung *Beta* wurde die Spezifität der Hybridisierung durch den Nachweis von zwei alternierenden und differentiell markierten Fragmenten der 18S-5,8S-25S rDNA verifiziert. Die eng aneinandergrenzenden DNA-Fragmente der Längen 380 bp und 400 bp wurden durch die alternierende Anordnung der Signale identifiziert. Dadurch wurde gezeigt, dass repetitive DNA-Sequenzen unter 1 kb an Chromatinfasern von *B. vulgaris* nachweisbar sind. Von FRANZ *et al.* (1996a) wurden Fragmente der ribosomalen DNA mit Sequenzlängen von 0,7 kb (25S rDNA) und 1 kb (18S rDNA) an Chromatinfasern aus Tomate detektiert. Die alternierende Anordnung gestattete ebenfalls eine Identifizierung von Hybridisierungssignalen der repetitiv vorliegenden Sequenzen.

Um die Qualität der Chromatinfasern aus *B. vulgaris* zu überprüfen, wurde die nachweisbare maximale Länge der Zielsequenz bestimmt und mit Literaturdaten verglichen. Von MESBAH *et al.* (2000) wurde eine *B. procumbens*-spezifische DNA-Sequenz (PBG-4) von 755 kb an Chromatinfasern einer monosomen Additionslinien von *B. vulgaris* detektiert. FRANZ *et al.* (1996a) ermittelten die Länge der 5S rDNA auf $657 \pm 62,6$ kb an Chromatinfasern von Tomate.

Durch eigene Untersuchungen wurden in *B. vulgaris* die ribosomalen 5S rRNA-Gene auf einer durchschnittlichen DNA-Sequenzlänge von 850 ± 330 kb nachgewiesen. Die relativ große Streuung der gemessenen Werte und das Auftreten von einzelnen stark verlängerten DNA-Fasern deuten darauf hin, dass die Chromatinfasern aus *B. vulgaris* strukturell sehr heterogen sind. Durch variierende Lyse der Kerne und Streckung des Chromatins entlang des Objektträgers können DNA-Fasern sehr unterschiedlicher Länge entstehen. Die Streckung der Chromatinfasern ist abhängig von der Anzahl der Zellen und der Fließgeschwindigkeit der Chromatin-Kernsuspension entlang des Objektträgers. Obwohl die Streckung hoch variabel ist und dadurch eine große Streuung der Meßdaten hervorgerufen wurde, waren die Mittelwerte der Distanzen in unterschiedlichen Präparaten gleich. Wird eine größere Anzahl von Messdaten (d.h. 10-15 Längenwerte) aus mindestens 3-4 unabhängig voneinander hergestellten Präparaten analysiert, so war eine Abschätzung der chromosomalen Länge im Genom von *B. vulgaris* möglich. Um eine exakte Bestimmung der Sequenzlängen durchführen zu können, ist allerdings ein direkter Vergleich mit einem internen Standard, d.h. die simultane Hybridisierung einer Sequenz mit bekannter DNA-Länge, unerlässlich. Weiterhin könnte der Einsatz von lysinbeschichteten Objektträgern, wie sie für *in situ*-Hybridisierungsanalysen an Chloroplasten-DNA (LILLY *et al.*, 2001) und BACs (JACKSON *et al.*, 1999) verwendet wurden, zu einer Steigerung der Stabilität der Chromatinfasern und zu einem sicherer Nachweis größerer chromosomaler Abschnitte beitragen.

Die molekulare Isolierung und Sequenzierung des 5S rDNA-Monomers aus *B. vulgaris* ergab eine Länge von etwa 350 bp, wobei auf die kodierende Region 120 bp entfallen (SCHMIDT *et al.*, 1994). Die durch *fibre*-FISH ermittelte Länge des 5S rDNA-Clusters entsprechen 1056-2640 Wiederholungseinheiten. In Weizen wurde durch PFGE die Anzahl der 5S rDNA Arrays auf 4700-5200 für ein kurzes Repeat und auf 3100 Kopien eines langen Repeats ermittelt (RÖDER *et al.*, 1992). In *Pisum sativum* wurden 6500-7000 Kopien nachgewiesen (ELLIS *et al.*, 1988). Die errechnete Anzahl der Wiederholungseinheiten in *B. vulgaris* scheint dagegen vergleichsweise gering. Allerdings

lassen weitere Signallinien, die eine Länge von 600 μm besaßen, eine höhere Kopienzahl (ca. 5605 *arrays*) der 5S rDNA und eine größere Länge der Gencluster (ungefähr 1962 kb) vermuten. Für eine eindeutige Bestimmung der Kopienzahl sind daher ergänzende molekulare Analysen durch PFGE (RÖDER *et al.*, 1992) oder durch vergleichende Hybridisierungsstudien an unterschiedliche Konzentration von Plasmid- und genomische DNA (KOUKALOVA *et al.*, 1989; SCHMIDT *et al.*, 1994) notwendig.

Durch die Etablierung der *fib*-FISH wurde die Voraussetzung für die Detektion von eng benachbarten Sequenzen und dadurch eine visuelle physikalische Genkartierung in Genom von *B. vulgaris* geschaffen. Eine mikroskopische Untersuchung von klonierten DNA-Fragmenten wird durch die Übertragung des *in situ*-Hybridisierungs Verfahrens auf den Nachweis von spezifischen DNA-Sequenzen entlang gestreckter BACs (JACKSON *et al.*, 1999), YACs (ROSENBERG *et al.*, 1995; FLORIJN *et al.*, 1995) oder Chloroplasten-DNA (LILLY *et al.*, 2001) ermöglicht. Durch die optische Analyse der Insertionen der BAC- oder YAC-Klone können chimäre Sequenzen und interne Deletionen identifiziert sowie überlappende Regionen, Distanzen und die Sequenzorganisation ermittelt werden.

Die physikalische Kartierung der genomischen DNA eines BACs mittels *fib*-FISH wurde im Rahmen dieser Arbeit etabliert. Dieses Verfahren kann einen substantiellen Beitrag zur Analyse der Insertionen von BACs aus der BAC-Bank, die aus der Linie PRO1 erstellt wurde (GINDULLIS *et al.*, 2001a), leisten und die Untersuchung der centromerischen Strukturen unterstützen (T. SCHMIDT, pers. Mitteilung).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Auflösung und Sensitivität der FISH optimiert und bisherige Nachweisgrenzen erreicht oder überschritten wurden. Im Genom aus Pflanzenmaterial der Gattung *Beta* wurden hochrepetitive, mittelrepetitive und unikale Sequenzen erfolgreich detektiert. Die Positionierung und Orientierung der verschiedenen DNA-Sequenzen wurde an mitotischen und meiotischen Chromosomen, an Chromatinfasern und an gestreckten BACs mit zunehmender Auflösung durchgeführt. Es wurde gezeigt, dass FISH sowohl zur Genlokalisierung, als auch zur detaillierten Untersuchung des strukturellen Aufbaus und der Organisation chromosomaler Regionen eingesetzt werden kann. Durch die chromosomale Lokalisierung der DNA-Sequenzen wird eine Integration von cytogenetischen Befunden und molekulargenetischen Daten ermöglicht. Anhand von hochauflösenden Verfahren der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung werden genetische und cytologische Methoden verknüpft und die Lücke

zwischen Molekularbiologie und Cytogenetik überbrückt. Die eigenen Arbeiten konnten einen weiteren Schritt zur Verkleinerung dieser Lücke beitragen.

4.2. Strukturelle Organisation von repetitiven Sequenzen in funktionellen Chromosomendomänen

Grundlage für die stabile Vererbung von Merkmalen ist eine korrekt ablaufende mitotische und meiotische Zellteilung. Intakte centromerische und terminale Chromosomenregionen sind Voraussetzung für eine exakte dreidimensionale Organisation (MCKNIGHT *et al.*, 2002) und für eine fehlerfreie Verteilung der Chromosomen in Mitose und Meiose (CARLTON & CANDE, 2002; MARTINEZ-PEREZ *et al.*, 1999; SYBENGA, 1999). Die Lokalisierung und strukturelle Analyse dieser funktionellen Chromosomendomänen im meiotischen Nukleus kann auf mögliche Mechanismen hinweisen, die an Paarung, Synapse und Rekombination der Chromosomen beteiligt sind (ARMSTRONG *et al.*, 2001). Vergleichende Studien zwischen Arten führen zur Aufdeckung der Genomentwicklung und phylogenetischer Zusammenhänge (HUDAKOVA *et al.*, 2001). Weiterführend könnten diese Studien zur Identifizierung von essentiellen oder nicht-funktionellen DNA-Segmenten beitragen.

Durch die in der Genomanalyse der Gattung *Beta* etablierten Verfahren, der *in situ*-Hybridisierung an Chromatinfasern und dekondensierten meiotischen Chromosomen, wurde die Analyse der Struktur und Organisation repetitiver Sequenzen in telomerischen und centromerischen Chromosomenregionen ermöglicht.

4.2.1. Struktur der terminalen Chromosomendomänen in *B. vulgaris*

Die physikalischen Enden der eukaryotischen Chromosomen, die sogenannten Telomere, bestehen aus einem Komplex von telomerspezifischen DNA-Sequenzen und verschiedenen Proteinen (ZAKIAN, 1995). Viele Arten enthalten telomerische Repeats, die aus hochkonservierten, G-reichen, tandemartig angeordneten Wiederholungseinheiten von 5-8 bp Länge bestehen. Untersuchungen an *A. thaliana* (RICHARDS & AUSUBEL, 1988) und an *Lycopersicon esculentum* (GANAL *et al.*, 1992) zeigten die Konsensussequenz 5'-TTTAGGG-3' als Monomer der telomerischen Repeats. Homologe Sequenzen sind an Chromosomenenden in vielen Arten bisher nachgewiesen worden (FUCHS *et al.*, 1995). Ausnahmen bilden Arten aus den Gattungen *Alliaceae* (PICH *et al.*, 1996) und *Asphodelaceae* (ADAMS *et al.*, 2001), in denen wahrscheinlich andere repetitive Sequenzfamilien die Funktion der telomerischen Repeats übernehmen. Auch in *B. vulgaris* wurden mit der aus *A. thaliana* klonierten Telomersequenz (pLT11; RICHARDS &

AUSUBEL, 1988) als Sonde die physikalischen Termini von Metaphasechromosomen identifiziert. Daraus folgt, dass die Telomere der *B. vulgaris*-Chromosomen die Konsensussequenz, die aus *A. thaliana* isoliert wurde, enthalten. Unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten der terminalen Signale lassen vermuten, dass auf den Chromosomen unterschiedliche Kopienzahlen der Repeats und damit unterschiedliche Arraylängen vorhanden sind. Durch Hybridisierung an Chromatinfasern aus *B. vulgaris* wurden die Längen der Telomerbereiche erstmalig mikroskopisch vermessen. Die telomerischen Repeats ordnen sich über einer Länge von 35 kb bis 170 kb an. Dieser Wert entspricht in etwa der Längen des telomerischen Repeatclusters in der Tomate (*L. esculentum*, 12-223 kb; ZHONG, 1998). Nach DNA-Restriktion und PFGE wurden in *N. tabacum* telomerspezifische Fragmente einer DNA-Länge von 60-160 kb aufgetrennt und detektiert (FAJKUS *et al.*, 1995). Auch diese Daten liegen im Messbereich der eigenen Analysen und bestätigen die variierende Anzahl der telomerischen Repeatcluster. Auf allen Chromosomentermi von *Oryza sativa ssp. japonica* wurde dagegen das telomerische Repeat über einen deutlich kürzeren Bereich von 3-4 kb durch FISH an Pachytänchromosomen und gestreckten Chromatinfasern nachgewiesen (OHMIDO *et al.*, 2001). Die Ergebnisse von OHMIDO *et al.* (2001) belegen, dass im pflanzlichen Genom die Länge der telomerischen Repeats sehr unterschiedlich sein kann. Weitere vergleichende Studien sind allerdings erforderlich, um Hinweise auf die Ursache der unterschiedlichen Telomerlängen in den Arten zu erhalten.

Die ungleichen Längen der telomerischen Repeatcluster auf den Chromosomen einer Art könnten sowohl die Folge der Addition einer variierenden Anzahl an Repeats durch die *template*-unabhängige Telomerase als auch das Resultat ungleicher *crossing-over* Ereignisse sein (PARDUE & DEBARYSHE, 1999). Auch ist nicht auszuschließen, dass terminale oder proximale divergente telomerische Sequenzabschnitte, wie sie beispielsweise in *A. thaliana* nachgewiesen wurden (RICHARDS *et al.*, 1992), für die Detektion von nur kurzen Arraylängen verantwortlich sind. Ist die Sequenzhomologie zwischen DNA-Sonde (pLT11) und Telomersequenz nicht ausreichend hoch, erfolgt keine DNA-DNA-Hybridisierung und demzufolge auch kein Nachweis durch FISH oder auch durch PFGE. Längenwerte, die durch FISH-Studien ermittelt werden, würden demnach nur einen Ausschnitt des Repeatarrays repräsentieren. Durch Hybridisierungsstudien bei verminderter Stringenz und ergänzende Sequenzanalysen könnten divergierte Sequenzabschnitte an den Chromosomenenden identifiziert werden.

Telomersequenzen sind oft proximal mit anderen tandemartig angeordneten repetitiven Sequenzen höherer Komplexität assoziiert (GARRIDO-RAMOS *et al.*, 1999; FAJKUS *et al.*, 1995). Diese subtelomerischen Repeats dienen wahrscheinlich dem Schutz der Chromosomenenden und der proximal anschließenden Chromosomenregionen vor endonukleolytischem Abbau. Da die terminalen euchromatischen Abschnitte der Chromosomen von Zuckerrübe und Gerste genreich sind (SCHMIDT & HESLOP-HARRISON, 1998, HESLOP-HARRISON, 2000) ist anzunehmen, dass ein Verlust dieser Chromosomenregionen für die Pflanze letal wäre. Weiterhin könnten die subtelomerischen Repeats auch für die Initiierung von Rekombinationereignissen in distalen Chromosomenabschnitten als auch für die Erkennung und Assoziation homologer Chromosomen in der meiotischen Prophase I mitverantwortlich sein (ZHONG *et al.*, 1998).

Subtelomerisch lokalisierte Satelliten-DNA sind bisher in zahlreichen pflanzlichen Arten, beispielsweise in den Genomen von Tabak, Tomate, Reis, Gerste und Roggen, identifiziert und charakterisiert worden (CHEN *et al.*, 1997; GANAL *et al.*, 1992; WU & TANKSLEY, 1993; BRANDES *et al.*, 1995; VERSHININ *et al.*, 1995). Auch im Genom der Wildrübenart *B. corolliflora* wurde durch JANSEN (1999) ein subtelomerisch lokalisierter *ApaI*-Satellit (pAV34) identifiziert und kloniert. Durch *Southern*-Hybridisierung ist dieser *ApaI*-Satellit pAV34 oder verwandte Sequenzen in allen *Beta*-Arten nachgewiesen worden (JANSEN, 1999). FISH-Studien zeigten, dass der pAV34 in unterschiedlichen Amplifikationsgraden an den Chromosomenenden von *B. vulgaris* und *B. procumbens* lokalisiert ist (JANSEN, 1999). Die eigenen *multi-colour* FISH der Telomersequenz (pLT11) und des subtelomerischen Satelliten (pAV34) auf Metaphasechromosomen von *B. vulgaris* deuteten auf eine eng benachbarte Organisation beider Sequenzen.

Molekulare Analysen der Chromosomentermi weisen auf unterschiedliche Organisationprinzipien der subtelomerischen und telomerischen Repeats in pflanzlichen Arten hin. Molekulare Studien in Gerste zeigten, dass subtelomerische und telomerische Repeats durch nicht homologe Sequenzen getrennt vorliegen (BROUN *et al.*, 1992) oder physikalisch eng benachbart sein können (RODER *et al.*, 1993). In *N. tabacum* wurde dagegen nachgewiesen, dass subtelomerische Repeats (HRS60) direkt an telomerische Sequenzen angrenzen (FAJKUS *et al.*, 1995).

In FISH-Studien an Chromatinfasern aus Tomate wurden telomerische und subtelomerische Repeatblöcke (TR und TGR1) sowohl separat, durch nichthomologe Sequenzen getrennt, als auch eng benachbart und überlappend detektiert (ZHONG *et al.*,

1998). Weitere molekulare und FISH-Analysen an Chromatinfasern und Pachytänchromosomen aus Reis (*O. sativa* ssp. *japonica*) zeigten, dass auf dem langen Arm der Chromosomen 6 und 12 die subtelomerischen Repeats (TrsA) durch mehrere tausend Basenpaare von telomerischen Sequenzen getrennt angeordnet sind (OHMIDO *et al.*, 2001).

Die eigenen Analysen der Chromosomentermi von *B. vulgaris* durch *fib*re-FISH bestätigten, dass pAV34-Sequenzblöcke unterschiedlicher Längen eng benachbart zu den telomerischen Repeats lokalisiert sind. Ähnlich der Beobachtungen in Tomate (ZHONG *et al.*, 1998), waren drei Prinzipien der Organisation beider Repeatfamilien an den Chromatinfasern aus *B. vulgaris* nachweisbar. Beide Sequenzblöcke können direkt aneinander grenzen oder durch nichthomologe Sequenzen getrennt sein. Auch Interspersion beider Sequenzfamilien innerhalb einer zentralen Region wurde detektiert. Separat lokalisierten Sequenzen und benachbarte Repeatblöcke, die eine Distanz größer als ungefähr 50 kb aufweisen, können durch die Ergebnisse der *fib*re-FISH nicht differenziert werden. Chromosomenenden auf denen ausschließlich eine der beiden Sequenzfamilien lokalisiert ist, wurden durch *multi-colour* FISH-Analysen an Metaphasechromosomen aus *B. vulgaris* nicht nachgewiesen. Da im Gegensatz zu den Beobachtungen in Tomate (ZHONG, 1998) an allen kondensierten Chromosomenenden eine Kolokalisierung beider Sequenzfamilien beobachtet wurde, deuten separate telomerische oder subtelomerische Signalfolgen darauf hin, dass auf einzelnen Chromosomenarmen die Arrays in einem relativ großem Abstand vom Telomer lokalisiert sind.

Die *fib*re-FISH-Daten an *B. vulgaris*-DNA zeigten, wie auch in Tomate und Reis (OHMIDO *et al.*, 2001; ZHONG, 1998), dass subtelomerische und telomerische Repeatfamilien innerhalb eines Genoms nach unterschiedlichen Organisationsprinzipien angeordnet sein können. Es scheint daher, dass jedes Chromosom eine individuelle Struktur und Anordnung der terminalen und subterminalen Regionen besitzt. Eine Zuordnung der Hybridisierungsmotive zu individuellen Chromosomen war allerdings in den durchgeführten Studien in *B. vulgaris* aufgrund der fehlenden Chromosomenstruktur der Chromatinfasern und der zu geringen Auflösung der FISH an Pachytänchromosomen nicht möglich. Um Organisationsmotive einzelnen Chromosomen zuordnen zu können, ist vielmehr die Hybridisierung von chromosomenspezifischen, distal lokalisierten Markern (z.B. BACs, die als Insertionen terminal lokalisierte DNA-Marker enthalten) und die simultane Hybridisierung von telomerischen als auch subtelomerischen Sequenzen notwendig. Chromosomenspezifisch hybridisierende BACs konnten bereits von DONG *et*

al. (2000) durch Selektion einer BAC-Bibliothek aus Kartoffel mit RFLP-Markern als Sonden identifiziert und zur FISH-Analyse erfolgreich eingesetzt werden.

Ein simultaner Nachweis von drei differentiell markierten DNA-Sequenzen wäre notwendig, um individuelle Strukturen der Chromosomentermi zu identifizieren. Technisch durchführbar wäre dies durch die Detektion einer dritten DNA-Sonde mit dem Fluorochrom Cy5, das im langwelligen Infrarotbereich emittiert, und mit einer CCD-Camera dokumentiert werden kann. Ist allerdings durch vorangehende molekulare Analysen die Anordnung der DNA-Sonden entlang der Chromatinfaser bereits geklärt, wird es möglich, die Sonden alternierend mit zwei Fluoreszenzfarben zu markieren und zu detektieren. Der Nachweis von sechs benachbarten BAC-Klonen, die mit Biotin oder Digoxigenin markiert wurden, gelang JACKSON *et al.* (2000) an Chromatinfasern aus *A. thaliana*. Da die Abfolge der BAC-Klone entlang der Chromatinfaser durch vorangehende molekulare Analysen bekannt war, konnten überlappende Bereiche und Distanzen ermittelt werden.

An Chromatinfasern aus tierischen und humanen Kernen ist die gleichzeitige Detektion von DNA-Sonden möglich, die mit fünf unterschiedlichen Fluorochrome gekoppelt wurden (LICHTER, 1997; SPEICHER *et al.*, 1996). Es scheint, dass in wenigen Jahren auch in der pflanzlichen Genomanalyse hochauflösende *fibres*-FISH mit drei oder mehr unterschiedlich markierten DNA-Sonden durchgeführt werden. Voraussetzung dafür ist eine geeignete technische Ausstattung (wie sie in der Humanforschung bereits eingesetzt wird) und dass die unterschiedlichen Emissionsspektren der Fluorochrome detektiert und differenziert werden können.

Die Untersuchungen der Chromosomenenden in *B. vulgaris* durch hochauflösende FISH-Verfahren konnte einen wesentlichen Beitrag zur Feinstrukturanalyse der terminalen Chromosomenstruktur leisten.

4.2.2. Organisation centromerassoziierter repetitiver DNA

Das Centromer höherer Eukaryonten ist eine essentielle, hoch differenzierte Struktur, die auf allen Chromosomen zu finden ist. Die Centromere haben vielfältige mitotische und meiotische Funktionen. Sie dienen z.B. als Anheftungsstellen der mitotischen und meiotischen Spindel, als Verbindung beider Schwesterchromatiden und als Erkennungsregionen für Proteine, die wichtige Aufgaben bei der Chromosomensegregation und -bewegung besitzen (CHOO, 1997). Eine intakte Centromerregion ist hinreichend für eine korrekte Verteilung von Chromosomen auf die

Tochterkerne in der Mitose und Meiose (MOORE, 1998). Cytologisch charakterisiert ist das Centromer durch eine von konstitutivem Heterochromatin flankierte primäre Einschnürung des Chromosoms (TRAUT, 1991). Die heterochromatischen Blöcke bestehen zumeist aus repetitive DNA, die während der Interphase, Mitose und Meiose kondensiert und als stark DAPI-gefärbte Regionen im Nukleus erkennbar sind (CHEN *et al.*, 1998; GINDULLIS *et al.*, 2001b; ARAGON-ALCAIDE *et al.*, 1996). In höheren Eukaryoten konnten bisher verschiedene centromerspezifische Satellitenfamilien charakterisiert werden. Die α -Satellitenfamilie aus humanen Chromosomen (SCHUELER *et al.*, 2001; GRADY, 1992), die *Tahiti*-, *Moora*- und *Bora-Bora*-Region charakterisierenden Satellitensequenzen aus *Drosophila melanogaster* (LE *et al.*, 1995) oder die pAL1-Satellitenfamilie aus *A. thaliana* (MARTINEZ-ZAPATER *et al.*, 1986) wurden beispielsweise detailliert untersucht. Bei der Charakterisierung der centromerischen Sequenzen zeigte sich, dass für ein aktives Centromer höherer Eukaryoten keine universell konservierte DNA-Sequenz verantwortlich ist. Die Centromerfunktion scheint epigenetisch festgelegt (KARPEN & ALLSHIRE, 1997; HESLOP-HARRISON *et al.*, 1999); d.h. eine erblich festgelegte Centromeraktivität korrespondiert nicht mit einer Primärstruktur der DNA. Vermutet wird, dass durch die Kombination verschiedener Sequenzen charakteristische Strukturen oder Konformationen (*higher-order structure*) ausgebildet werden, an die die centromerbindenden Proteinen (z.B.: CENP A) binden und somit die Funktionalität einer Centromerregion gewährleisten (KARPEN & ALLSHIRE, 1997; CHOO, 1997).

In pflanzlichen Genomen wurden sowohl hoch repetitive Satelliten-DNA unterschiedlicher Länge und Sequenzdivergenz als auch nicht Satelliten-DNA durch *in situ* Hybridisierung in centromerischen Regionen lokalisiert (BRANDES *et al.*, 1997; ARAGON-ALCAIDE *et al.*, 1996, JIANG *et al.*, 1996). Die Funktionen dieser Sequenzen ist bisher ungeklärt. Im humanen Genom wurde Interaktion der α -Satellitensequenz an ein hoch konserviertes CENP-B-Bindungsproteins, das die Anlagerung der Kinetochorproteine vermittelt, nachgewiesen (MURO *et al.*, 1992). Sequenzhomologie zum Proteinbindungsmotiv der CEN-B-Box des α -Satelliten (MURO *et al.*, 1992) wurden in centromerischer DNA aus *A. thaliana* (AtCon: HESLOP-HARRISON *et al.*, 1999) und in Geteiden (CCS1: ARAGON-ALCAIDE *et al.*, 1996) gefunden. Dies könnte auf funktionelle Sequenzen innerhalb der centromerischen Satelliten hinweisen. Heterochromatische Regionen sogenannte *knobs* oder Neocentromere, die in interstitiale Position auf den Chromosomenarmen von Mais identifiziert wurden (PEACOCK *et al.*, 1981), und die centromerähnliches Verhalten zeigen

können (HIATT *et al.*, 2002), weisen ebenfalls auf mögliche centromerische Funktionen von Satellitenrepeatclustern im pflanzlichen Genom hin.

Molekularen Untersuchungen der Centromerregion in unterschiedlichen Arten haben verdeutlicht, dass die Identifizierung von centromerspezifischen Sequenzfamilien nicht ausreicht, um die Funktionalität der Centromere zu klären. Eine Analyse, der Struktur und Sequenzorganisation in der centromerischen Region ist notwendig. Durch Anwendung hochauflösender FISH-Verfahren, die im Rahmen dieser Arbeit in der Genomanalyse der *Beta*-Arten etabliert und eingesetzt wurden, konnte eine physikalische Übersichtskarte der centromernahen Region der *B. procumbens*-Chromosomen erstellt werden.

Es wurde gezeigt, dass die *Sau3AI*-Satellitensequenz pTS5 in einer zentralen Domäne hochamplifiziert vorliegt. Der pTS5-Block wird zu beiden Seiten durch die zur nicht-homologen *Sau3AI*-Familie gehörende Satellitensequenz pTS4.1 flankiert. Die Grenzen zwischen beiden Sequenzblöcken sind fließend und enthalten sowohl pTS5- als auch pTS4.1-Repeats. Die Ergebnisse zeigten weiterhin, dass die *Sau3AI*-Satellitenblöcke von kleinen Abschnitten aus komplex aufgebauter DNA wie Retrotransposons unterbrochen werden. Kolokalisierend mit pTS5-Repeatblöcken wurden Ty3-*gypsy*-Retrotransposons (pBp10) nachgewiesen (GINDULLIS *et al.*, 2001b).

Ty3-*gypsy*-Retrotransposons gehören zu den dispers verteilten repetitiven Elementen im pflanzlichen Genom (BENNETZEN, 1976). In vielen pflanzlichen Arten wurden bereits Ty3-*gypsy*-Retrotransposons in pericentromerischen Chromosomenregionen nachgewiesen (z.B. Getreiden: *pSau3A9*, PRESTING *et al.*, 1998, JIANG *et al.*, 1996; Mais: CentA, ANANIEV *et al.*, 1998a). Auf Chromosomen von Hirse (*Sorghum vulgare*) wurden sowohl Ty3-*gypsy*- als auch Ty1-*copia*-Retroelemente centromerassoziiert detektiert (MILLER *et al.*, 1998). In der pericentromerischen Region von Chromosom 5 aus *A. thaliana* konnten ebenfalls zwei Ty3-*gypsy* und ein Ty1-*copia*-Element identifiziert werden (TUTOIS *et al.*, 1999). Welche Funktion die Retroelemente in den centromernahen Regionen übernehmen und warum *gypsy*- und *copia*-Elemente sowohl getrennt als auch benachbart auftreten, ist bisher nicht bekannt.

In den FISH-Studien der *B. procumbens*- Chromosomen konnten Sequenzen der *EcoRI*-Satellitenfamilie (pEV1) in niedriger Kopienzahl centromernah und dem *Sau3AI*-Satelliten engbenachbart detektiert werden. Desweiteren wurde auf einigen Chromosomen von *B. procumbens* das *AluI*-Satellitenrepeat (pAp4) in hoher Kopienzahl in pericentromerischer Regionen chromosomal lokalisiert (DECHYEVA *et al.*, eingereicht).

Neben den *Sau3AI*-Satelliten sind demnach kleine Repeatblöcke anderer Satellitenfamilien in der centromernahen Region vorhanden. Das Organisationsprinzip der pericentromerischen Region von *B. procumbens* korreliert mit Beobachtungen in anderen Organismen (DONG *et al.*, 1998b; ANANIEV *et al.*, 1998a; JIANG *et al.*, 1996). In einem zentralen Region liegen konservierte Satellitrepeats, sogenannte *major repeats*, in hoher Kopienzahl vor. Umgeben wird dieser zentrale Bereich von divergierten Sequenzen und heterologen Repeatfamilien, sogenannten *minor repeats*, oder Retroelementen (TUTOIS *et al.*, 1999; HENIKOFF, 2002). Auch im Centromer von *A. thaliana*-Chromosomen wurden in einer zentralen Domäne Satelliten der pAL1-Sequenzfamilie nachgewiesen, die von nicht homologen repetitiven Sequenzen flankiert werden. Die Domänen werden unterbrochen von Retroelementen (HESLOP-HARRISON *et al.*, 1999). Eine ähnliche strukturelle Hierarchie findet sich auch in centromerischen Strukturen der humanen Chromosomen. Zentrale Blöcke des α -Satelliten sind umgeben von nicht homologen Satelliten (1-3 β -Satelliten) (CHOO, 1997).

Die zwischen Pflanze und Tier konservierten Prinzipien des Centromeraufbaus zeigen, dass eine Hierarchie von centromerassoziierten repetitiven Elementen evolutionär früh entwickelt wurde und eine bedeutende Rolle für die Funktionalität des Centromeres haben muss. Weiterhin wurde beobachtet, dass die Abundanz repetitiver Sequenzklassen in den pflanzlichen Centromerregionen zwischen den Chromosomen und den Arten hoch variabel ist (MOORE, 1997; HESLOP-HARRISON *et al.*, 1999). Chromosomen-spezifische Amplifikationsgrade centromerischer Repeats wurden beispielsweise in *Arabidopsis* und Mais beobachtet (HESLOP-HARRISON *et al.*, 1997; CHEN *et al.*, 2000). Auf Metaphasechromosomen von *B. procumbens* wurden die *Sau3AI*-, pAp4- und *EcoRI*-Satellitenrepeats als auch die Ty3-*gypsy*-Retroelemente in variierender Kopienzahl nachgewiesen (GINDULLIS *et al.*, 2001b; SCHMIDT *et al.*, 1998; DECHYEVA *et al.*, eingereicht). Trotz der großen Differenzen im Amplifikationsgrad der Satellitenfamilien auf den Chromosomen scheint die hierarchische Struktur der Repeats beibehalten.

Das Centromer der *B. procumbens*-Chromosomen ist eine komplexe Struktur bestehend aus Satelliten-DNA und Retroelementen mit unterschiedlicher Abundanz auf den Chromosomen. Aus den Untersuchungen der centromerischen Region von *B. procumbens* durch *in situ*-Hybridisierung an Pachytänchromosomen und Chromatinfasern wurde ein Centromerstrukturmodell der Wildrübe *B. procumbens* erstellt, das Grundlage für weitere molekularen und strukturellen Analysen der centromernahen Chromosomenregion innerhalb der Arbeitsgruppe ist (GINDULLIS *et al.*, 2001b).

4.2.3. Verhalten von Centromer- und Telomerregionen in frühen meiotischen Teilungsphasen

Die Meiose besteht aus zwei komplexen und hochspezialisierten Zellteilungen, die letztendlich zur Bildung von haploiden Zellen führen. Die kritischen Prozesse der Meiose ereignen sich in der frühen Prophase I, in der homologe Chromosomen assoziieren und paaren (Chromosomensynapse). Im Pachytän werden die homologen Chromosomen über den synaptischen Komplex (*synaptonemal complex*: SC) miteinander verbunden, dessen Morphogenese und Struktur bereits mehrfach untersucht wurde (ZICKLER & KLECKNER, 1999; WALKER & HAWLEY, 2000). Im Gegensatz dazu wurden die präsynaptischen Vorgänge bisher selten charakterisiert (SCHWARZACHER, 1997; MIKHAILOVA *et al.*, 1998; BASS *et al.*, 2000). Der Zeitpunkt der Erkennung und Paarung homologer Chromosomen scheint in den Arten unterschiedlich (ARMSTRONG *et al.*, 2001; CARLTON & CANDE, 2002). Auch die Bedeutung der in vielen Arten beobachtete Clusterung von Centromeren oder Telomeren an der Kernmembran (*bouquet stage*) ist bisher unverstanden (BASS *et al.*, 1997; MIKHAILOVA *et al.*, 1998). Durch die Lokalisierung der centromerischen und terminalen Chromosomenregionen im Nukleus ist es möglich, die Ausrichtung der Chromosomen, ihre Lage und ihr Verhalten in unterschiedlichen meiotischen Stadien zu beobachten und zu analysieren (ARMSTRONG *et al.*, 2001; BASS *et al.*, 1997; MARTINEZ-PEREZ *et al.*, 1999; MIKHAILOVA *et al.*, 2001). In *A. thaliana* wurde aufgezeigt, dass Assoziation und Paarung der Telomere und Centromere in den frühen meiotischen Phasen nicht zeitgleich stattfindet (ARMSTRONG *et al.*, 2001). In Mais wurde durch BASS *et al.* (1997) nachgewiesen, dass Telomere zunächst während der premeiotischen Interphase und ein zweites Mal am Ende der Leptotänphase gruppieren und sich in der Kernperipherie anordnen. Interessanterweise liegen die Telomere zwischen diesen beiden Phasen dispers über den gesamten Nukleus verteilt vor (BASS *et al.*, 1997; 2000).

In *B. vulgaris* wurde im frühen Leptotän zunächst eine Vergrößerung des Kernvolumens beobachtet. Eine Ausbreitung des Chromatins in interchromosomale Zwischenräume ist für eine Neuordnung und Erkennung homologer Chromosomen notwendig und verursacht die Vergrößerung der Chromosomen und des Kernvolumens (SYBENG, 1999). Die Lokalisierung von telomerischen und centromerischen Repeat wies im Kern von *B. vulgaris* auf keine Clusterbildung oder Paarung von Chromosomentermi oder centromerischen Regionen hin. *In situ*-Hybridisierung des centromerisch lokalisierten *Sau3AI*-Satelliten pTS5 an PMC von *B. procumbens* deutet dagegen auf eine bipolare Orientierung der centromerischen Chromosomenregionen in der späten Leptotänphase

(T.SCHMIDT pers. Mitteilung). Einschränkend muss erwähnt werden, dass räumliche Muster, wie beispielsweise eine parallele Anordnung entlang der inneren Kernmembran eindeutig nur nach dreidimensionale Rekonstruktion der Kernstruktur durch *laser-scanning*-Mikroskopie (BASS *et al.*, 1997) nachweisbar sind.

In den nachfolgenden Studien wurde durch *in situ*-Hybridisierung einer 5S rDNA-Sonde, die die pericentromerische Region eines Chromosomenpaares (Chromosom 4) markiert (SCHMIDT *et al.*, 1994), die Chromosomenassoziation im Zygotän, die Chromosomensynapse im Pachytän und die darauffolgende partielle Trennung der Bivalente in der Diakinese bestätigt (Abb. 6). Durch die Hybridisierung der 5S rDNA-Sonde wurde die centromerische Region nur eines Chromosompaares lokalisiert. Durch Nachweis der interkalare und pericentromerische Satellitenrepeats im konstitutiven Heterochromatin der meiotischen *B. vulgaris*-Nuklei war die Detektion aller centromerischer und interstitialen Regionen im Nukleus möglich. Die Assoziation von tandemartig angeordnete Sequenzen mit heterochromatischen Chromosomenregionen des Pachytän wurde auch in Mais, *A. thaliana* oder Reis beobachtet (CHENG *et al.*, 2001b). Dies deutet darauf hin, dass tandemartig angeordnete repetitive DNA eine direkte oder indirekte Rolle bei der Kondensation der DNA übernehmen könnte und möglicherweise eine Interaktion mit spezifischen Proteinen während der meiotischen Prophase erfolgt.

Die Assoziation und Fusion des konstitutivem Heterochromatins aller homologen Chromosomen während der Prophase, sowie die darauffolgende Trennung der Satelliten in der Diakinese wurde durch die *in situ*-Hybridisierung der pericentromerischen und interkalaren Satellitenrepeats bestätigt. Die Signale sind zunächst über den gesamten Nukleus verteilt, treten dann zunehmend paarweise und in verminderter Anzahl auf. Eine Anordnung der Chromosomen im Nukleoplasma oder entlang der Kernmembran konnte auch während der Zygotän- und Pachytänphase der PMCs von *B. vulgaris* nicht beobachtet werden. DONG *et al.* (1998a) wiesen eine Rab1-Formation von Telomeren und Centromeren in PMCs einiger Getreiden (Weizen, Roggen, Gerste und Hafer) nach. In Mais, Reis und *Sorghum* wurde dagegen eine disperse Anordnung beobachtet (DONG *et al.*, 1998a). Die Ausbildung einer Rab1-Formation scheint für die Synpase der homologen Chromosomen in Mais, Reis, *Sorghum* und auch *B. vulgaris* nicht notwendig. Im Zygotän lagern sich die pericentromerischen und interkalaren Heterochromatinregionen zu einem dichten Knoten zusammen, aus dem einzelne Chromatinfasern herausragen. Ein derartiger Chromatinknoten wurde ebenfalls in der Meiose von *A. thaliana* beobachtet (ROSS *et al.*, 1996) und wird als *synizetic knote* bezeichnet (Synzesis *gr.-lat.*: zusammenziehen) (DE

JONG, 1981). ROSS *et al.* (1996) vermuten, dass der Chromatinknoten eine analoge Struktur zur klassischen *bouquet*- oder Rabl-Anordnung darstellt, die in Insekten und Säugerzellen beobachtet wurde (RABL, 1985).

In situ-Hybridisierung der auf allen Chromosomen vorhandenen telomerischen Repeats (pLT11) und der terminal auf Chromosom 1 lokalisierten 18S-5,8S-25S rDNA ließen keine geregelte Anordnung der Chromosomen im Leptotän erkennen. Im Zygotän dagegen sind die aus dem Chromatinknoten herausragenden terminalen Chromosomenabschnitte zu einer Nukleushälfte hin ausgerichtet. Die bipole Orientierung der Telomere bestätigen, dass der Chromatinknoten eine analoge *bouquet*-Formation darstellt (ROSS *et al.*, 1996). Die aus dem *synizetic knote* herausragenden Chromosomenenden waren zum größten Teil ungepaart. Demnach ist der Chromatinknoten eindeutig einem Stadium vor dem Pachytän und nicht, wie zunächst von DE JONG & OUD (1979) für *B. vulgaris* postuliert, einem frühen Diplotänstadium zuzuordnen. Der Chromatinknoten ist Ausgangs-, aber nicht Endpunkt einer vollständigen Paarung der homologen Chromosomen (SUZUKI *et al.*, 1997). Da die Chromosomenenden des Zygotänstadiums noch relativ stark dekondensierte DNA enthalten, sind Chromosomen des Zygotäns zur physikalischen Feinkartierung von terminal lokalisierten DNA-Sequenzen geeignet. Dies konnte durch den erstmaligen simultanen Nachweis der 18S-5,8S-25S rDNA und telomerische Repeats (pLT11) terminal auf Chromosom 1 von *B. vulgaris* bestätigt werden. Die hohe Auflösung der Chromosomenenden im Zygotänstadium ermöglichte die proximale Position der 18S-5,8S-25S rDNA und die distale Lage der telomerischen Repeats eindeutig nachzuweisen. Durch FISH an kondensierten Chromosomen der mitotischen Metaphase oder Prometaphase konnten beide Sequenzen zuvor nicht gleichzeitig lokalisiert werden.

Der Chromatinknoten lockert sich im Pachytän auf. Alle homologen Chromosomen liegen einschließlich ihrer Telomerbereiche vollständig gepaart vor und sind über den synaptonemalen Komplex miteinander verbunden. Durch FISH der interkalaren sowie der pericentromerischen Satellitensequenzen wurden die heterochromatischen Blöcke entlang der Pachytänchromosomen identifiziert. Die Anzahl der Signale ist im Vergleich zum mitotischen Metaphasenukklus auf die Hälfte reduziert. Dies bestätigt die vollständige Synapse der homologen Chromosomen. Da unterschiedliche Kopienzahlen der Satellitenrepeats auf den Chromosomen existieren, entstanden chromosomenspezifische Hybridisierungsmuster. Bemerkenswert war, dass ein bis zwei stark DAPI-markierte centromernahe Chromosomenregionen durch *multi-colour* FISH des interkalaren *EcoRI*-Satelliten pEVI und des *BamHI*-Satelliten pBV1 keine Hybridisierung zeigten. Interessant

wäre eine Charakterisierung dieser eventuell chromosomenspezifischen Satellitensequenzen. Da eine ständige Homogenisierung der Repeatsequenzen zur Äquilibration zwischen den Chromosomen führt, sind chromosomenspezifische Satelliten-Repeats sehr selten in Pflanzengenomen und nur in Einzelfällen beschrieben (WANG *et al.* 1995, GAO *et al.*, 2001).

Dem Pachytän folgt ein Stadium mit diffusen Bivalentstrukturen, in denen vor allem die terminalen Chromosomenabschnitte stark dekondensiert erscheinen, während die centromernahen Regionen kondensiert bleiben. Die dekondensierten Chromosomenenden in der Diakinese eignen sich zur physikalischen Kartierung eng benachbarter Sequenzen. Dies konnte durch die Doppelhybridisierung zweier translokationsspezifischer YACs an Chromosomen der Linie A906001 gezeigt werden. Eine Auflösung bis zu 200 kb wurde beobachtet. DNA-Sequenzen, die in stark kondensierten, zentralen Chromosomenregionen lokalisiert sind, sind an Chromosomen in der Diakinese nur schwer kartierbar. Ein Nachweis von Univalenten bzw. Trivalenten, Chiasmata oder Paarungen zwischen homoeologen Chromosomen im Diplotän und in der Diakinese erlaubt Rückschlüsse auf Homologiegrad, Phylogenie oder Vererbung von addierten Chromosomen, Chromosomenfragmenten oder integrierten DNA-Fragmenten. Die Ergebnisse können zu Hinweisen auf die Transmission von eingekreuzten Merkmalen in Hybridgenomen führen (BRANDES *et al.*, 1987). Die Diakinese ist daher ein cytogenetisch hochinteressantes meiotisches Stadium insbesondere nach interspezifischen Kreuzungen oder molekularen Veränderungen der Genome.

Durch das Studium der frühen meiotischen Stadien wurde ein Beitrag zur Analyse der präsynaptischen Vorgänge in der Meiose von *B. vulgaris* geleistet und die Voraussetzung für den Einsatz dieser Chromosomenstadien mit dekondensierter DNA für die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung ermöglicht. Die genaue Charakterisierung der meiotischen Chromosomenstadien ist Grundlage für den Erfolg einer FISH mit hoher Auflösung und damit für die physikalische Feinkartierung der Chromosomen unendbehrlich.

4.3. Chromosomale Verteilung pflanzlicher Retrotransposons

Zu den repetitiven Sequenzen im pflanzlichen Genom gehören neben den tandemartig angeordneten Satellitensequenzen weitere Sequenzklassen, die meist durch ihre disperse Genomorganisation charakterisiert sind. Im Unterschied zu den *Non-LTR*-Retrotransposons sind die *LTR*-Retrotransposons (*LTR: long terminal repeats*) durch direkte terminale Wiederholungssequenzen gekennzeichnet. Die Klasse der *LTR*-

Retrotransposons sind bislang am intensivsten analysiert worden. Sie wird in Ty1-*copia*- und Ty3-*gypsy*-Retrotransposons unterteilt (BENNETZEN, 1996).

Ziel der eigenen Arbeiten war eine vergleichende chromosomale Lokalisierung der unterschiedlichen Retroelementklassen im Genom von *B. vulgaris*. Als DNA-Sonde für die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung wurde eine Population divergierter Sequenzen der Reversen Transkriptase eingesetzt, die durch PCR mit Ty1-*copia*-spezifischen Primern aus genomischer DNA von *B. vulgaris* amplifiziert wurden. Die FISH-Studien zeigen, dass Ty1-*copia*-Retrotransposons relativ gleichmäßig über die euchromatischen Regionen des Genoms verteilt und in hoher Kopienzahl auf allen Chromosomen vorhanden sind. In anderen pflanzlichen Arten wurde ebenfalls eine disperse Ausbreitung der Ty1-*copia*-Retrotransposons über die euchromatischen Chromosomenregionen beobachtet (KUMAR *et al.*, 1997; BRANDES *et al.*, 1997; HESLOP-HARRISON *et al.*, 1997). Bemerkenswert für die Verteilung der Ty1-*copia*-Retrotransposons in *B. vulgaris* ist ihr Ausschluss aus den chromosomalen Bereichen der tandemartig angeordneten Gene der 18S-5,8S-25S rRNA, die sich terminal auf Chromosom 1 befinden, und der auf allen Chromosomen pericentromerisch lokalisierten *Bam*HI-Satelliten. Studien an *Vicia faba* zeigten, dass in den Regionen eines interkalaren Satelliten keine Ty1-*copia*-Elemente lokalisiert sind (BRANDES *et al.*, 1997; PEARCE *et al.*, 1996). Dies deutete darauf hin, dass der Ausschluss aus Satellitenblöcken, die einer ständigen Homogenisierung unterliegen, ein artübergreifendes Prinzip für die Verteilung der Ty1-*copia*-Retroelemente im Genom ist.

In einigen Arten liegen die Ty1-*copia*-Retrotransposons dagegen nicht dispers im Genom verteilt vor. So wurden in *Allium cepa* die Ty1-*copia*-Retrotransposons in terminalen heterochromatischen Regionen und in *A. thaliana* und *Cicer arietum* im perizentrischen Heterochromatin lokalisiert (HESLOP-HARRISON *et al.*, 1997; nach KUMAR & BENNETZEN, 1999). Die Ausbreitung von Retrotransposons im Genom scheint artspezifischen Prinzipien oder Mechanismen zu unterliegen.

Die zweite LTR-Retrotransposonfamilie, die Ty3-*gypsy*-Retroelemente, akkumuliert bevorzugt im perizentrischen Heterochromatin. In *B. vulgaris* wurden Ty3-*gypsy*-Retrotransposons, wie auch in Mais und in Getreiden (*Gramineae*), im centromerischen Heterochromatin nachgewiesen (GINDULLIS *et al.*, 2001b; ANANIEV *et al.*, 1998a; MILLER *et al.*, 1998; PRESTING *et al.*, 1998). Die häufig beobachtete Akkumulation der Ty3-*gypsy*-Retroelemente in der centromernaher Region spricht für eine funktionelle Bedeutung der Ty3-*gypsy*-Retroelemente im Centromer (MILLER *et al.*, 1998; PRESTING *et al.*, 1998).

Nach *in situ*-Hybridisierung der Ty3-gypsy-ähnlichen Retroelementen wurden im Genom von *B. vulgaris* zusätzliche schwache Signale, dispers über alle Chromosomen verteilt, beobachtet. Dies lässt vermuten, dass die Ty3-gypsy-Retroelemente in niedriger Kopienzahl im gesamten Genom verteilt vorliegen. Die hohe Anzahl der Ty3-gypsy-Retroelemente in centromerischer Region und die gleichzeitige niedrigen Abundanz in anderen chromosomalen Bereichen könnte durch centromerspezifische Targetsequenzen verursacht werden, die die Integration der Kopien sehr effektiv initiieren und hohe Amplifikationsrate hervorrufen. Daneben könnten unterschiedlich effektive Mechanismen der Transkription oder Transposition in centromerischer und nicht-centromerischer Chromosomenregion eine differierende Ausbreitung der Ty3-gypsy-Elemente im Genom bedingen. Aufgrund der sehr komplexen Transkriptions- und Transpositionprozesse scheinen allerdings Analysen der Mechanismen in unterschiedlichen chromosomalen Regionen derzeit noch schwer durchführbar.

Desweiteren wurden - vergleichend zur Verteilung der LTR-Retrotransposons (Ty1-copia und Ty3-gypsy) im Genom - die zu den Non-LTR-Retrotransposons gehörende Klasse der LINE (*long interspersed nuclear elements*) chromosomal lokalisiert. Die Sequenzen des LINE-Typs *BNRI* wurden aus dem Genom der Zuckerrübe isoliert und molekular charakterisiert (SCHMIDT *et al.*, 1995; KUBIS *et al.*, 1997). Durch Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung war eine chromosomale Lokalisierung möglich. Die LINEs sind dispers verteilt, aber im Vergleich zu den relativ uniform auf den Chromosomen verbreiteten Ty1-copia-Retroelementen zusätzlich regional amplifiziert. Einige starke Hybridisierungssignale, die durch Signalpunkte auf beiden Chromatiden verifiziert werden, weisen auf die Bildung von Clustern oder Sequenzblöcken bevorzugt in terminalen Regionen hin. Die telomernahen Sequenzblöcke könnten durch Integration von Non-LTR-Retrotransposons in bereits vorhandene LINEs der jeweiligen Familie entstanden sein. Ein möglicher Mechanismus für die Akkumulation von LINEs in subtelomerische Regionen wurde für das LINE Zepp aus *Chlorella* beschrieben (HIGASHIYAMA *et al.*, 1997). Durch mehrfache Integration im 5'-Sequenzbereich eines inserierten LINEs entstehen Cluster mit verkürzten 5'- und vollständigen 3'-Enden der LINE-Sequenz.

Analog zur regionalen Häufung von LINEs gibt es in *B. vulgaris* auch chromosomale Regionen, aus denen die untersuchten LINEs ausgeschlossen sind (KUMAR & BENNETZEN, 1999). Es handelt sich hierbei ebenfalls um die Gene der 18S-5,8S-25S rDNA, die sehr dynamisch sind und einer ständigen Homogenisierung unterliegen. Die große Dynamik der rRNA-Gene scheint den Ausschluss aller untersuchten Retroelemente (der LTR- und der

non-LTR-Retrotransposons), die sich nur langsam über große Zeiträume hinweg im Genom ausbreiten, zu bedingen.

Für die zusätzlich durchgeführten molekularen Untersuchungen der Ty1-*copia*-Retroelemente wurden Sequenzenabschnitte der reversen Transkriptase aus den vier Sektionen der Gattung *Beta* isoliert und kloniert. Der DNA-Sequenzvergleich zeigte eine hohe Heterogenität der Klone auf DNA-Ebene. Molekulare Studien der Ty1-*copia*-Sequenzen aus Kartoffel, *Vicia* oder den Getreiden wiesen ebenso auf einen hohen Polymorphismus der Ty1-*copia*-Retrotransposons im pflanzlichen Genom hin (FLAVELL *et al.*, 1992; KATSIOTIS *et al.*, 1996; KUMAR & BENNETZEN, 1999; PEARCE *et al.*, 1996).

Die Ursache der extreme Variabilität und Heterogenität von Ty1-*copia*-Retrotransposons könnte auf zwei Zusammenhängen beruhen:

1. Die Reverse Transkriptase ist ein Enzymkomplex mit DNase-Aktivität, die keine *proofreading*-Funktion besitzt. Bei der Umschreibung von RNA in DNA werden auftretende Fehler nicht korrigiert. Daraus resultiert eine 10^6 -fach erhöhte Mutationsrate, die die Entstehung von individuellen Subfamilien bedingt.
2. Die fehlende phänotypische Ausprägung und der dadurch bedingte fehlende Selektionsdruck auf DNA-Ebene verursacht eine Anhäufung von Mutationen und darausfolgend eine hohe Heterogenität der Ty1-*copia*-Sequenzen.

Trotz des Polymorphismus der Sequenzen war eine genomspezifische Hybridisierung der Ty1-*copia*-Retrotransposons in monosomen Additionslinien von *B. vulgaris* zu beobachten. Molekulare Studien in anderen Arten bestätigten, dass die Sequenzheterogenität der Ty1-*copia*-Retroelemente der phylogenetischen Beziehung der Arten folgt (KAMM *et al.*, 1995; KATSIOTIS *et al.*, 1996). Obwohl beispielsweise eine große innergenomische Heterogenität der Ty1-*copia*-Retrotransposons im Genomen von polyploiden Pflanzen nachgewiesen wurde, konnte eine genomspezifische Hybridisierung der Retrotransposons in *Southern*-Analysen beobachtet werden (z.B. tetraploider Wildhafer *Avena vaviloviana*; KATSIOTIS *et al.*, 1995). Artspezifische Ty1-*copia*-Retrotransposonfamilien wurden ebenso in weiteren Untersuchungen an Gymnospermen und Angiospermen identifiziert (BRANDES *et al.*, 1997).

Die Heterogenität der Retrotransposonsequenzen scheint das Ergebnis einer vertikalen Transmission zu sein, die im Verlauf der Phylogenie der Arten stattgefunden hat. Ein horizontaler Transfer von Ty1-*copia*-Retrotransposons zwischen Pflanzenarten schien bislang demgegenüber unwahrscheinlich (KUMAR & BENNETZEN, 1999). Denn neuere

Daten von STUART-ROGERS & FLAVELL (2001) haben allerdings deutliche Hinweise auf einen horizontalen Transfer ergeben. Die Detektion von *envelope (env)*-Gensequenzen in pflanzlichen Retroelementen bestätigt zudem die Existenz von potentiell funktionellen Retroviren in pflanzlichen Genomen (LATEN HM, 1999; CARLOS *et al.*, 2001; DAVID *et al.*, 2002). Es ist daher wahrscheinlich, dass ein horizontaler Austausch von pflanzlicher DNA zwischen den Arten erfolgen kann.

Die biologische Funktion der Retrotransposon ist bislang ungeklärt. Die große Heterogenität der Retrotransposonsequenzen führt zu einer größeren genetischen Variabilität und daher möglicherweise zur verbesserten Adaption der Arten (Biodiversität). Die Retrotransposons würden so eine bedeutende Rolle bei der Evolution der Arten übernehmen (KUMAR & BENNETZEN, 1999). Der Nachweis von Retroelementen oder Retrotransposonfragmenten innerhalb regulatorischer Region von Genen deutet überdies darauf hin, dass Retrotransposons einen Einfluß auf die Funktion oder Evolution von Genen ausüben. Die Integration von Retrotransposons innerhalb regulatorischer Sequenzabschnitte könnte zur Inaktivierung der Gene führen, ferner Genduplikation, ungleiche Rekombination oder andere Änderungen beeinflussen (KIDWELL & LISCH, 1997). Auch die hohe Abundanz einiger Retrotransposonklassen in centromerischen und telomerischen Regionen könnte letztlich auf eine funktionelle Bedeutung der Retroelemente in diesen chromosomalen Abschnitte hindeuten (HIGASHIYAMA *et al.*, 1997; MILLER *et al.*, 1998; PRESTING *et al.*, 1998).

4.4. Karyotypanalyse pflanzlicher Genome durch Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung

Eine Differenzierung und Identifizierung individueller Chromosomen der mitotischen Metaphase ist durch Verfahren der klassischen Cytologie in vielen Genomen möglich. Der Vergleich von Chromosomenarmlängen und Heterochromatinmustern, die durch C-, N- oder Q-*banding* entstehen, kann zur Zuordnung von Chromosomenpaaren und der Erstellung eines Karyogramms beitragen (nach TRAUT, 1991). Treten im Genom allerdings Chromosomen mit ähnlicher Morphologie auf (wie z.B. im Genom von *B. vulgaris*, *A. thaliana* oder Reis), sind *banding*-Verfahren oder Längenmessungen für die Klassifizierung einzelner Chromosomen oft nicht ausreichend. Durch Bindung der Fluoreszenzfarbstoffe DAPI, das bevorzugt AT-reiche heterochromatische Regionen markiert, und Propidiumjodid (PI), das relativ gleichmäßig in Doppel- und Einzelstrang-DNA interkaliert (HESLOP-HARRISON & SCHWARZACHER, 1996), können

chromosomenspezifische reverse PI-DAPI Banden auf den Chromosomen erzeugt werden (PETERSON *et al.*, 1999, LIM *et al.*, 2001). Aber auch diese Technik ist für eine Karyotypanalyse in vielen pflanzlichen Arten mit kleinen Chromosomen nicht geeignet.

Durch Entwicklung der Verfahren der molekularen Cytogenetik insbesondere dem Einsatz der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung wird die individuelle Markierung von Chromosomen durch repetitive oder unikale DNA-Sonden ermöglicht. Durch die Lokalisierung der rDNA wurden einzelne Chromosomenpaare in zahlreichen Genomen erfolgreich charakterisiert (ELLIS *et al.*, 1988; SCHMIDT *et al.*, 1994; SCHONDELMAIER *et al.*, 1997; LEITCH & HESLOP-HARRISON, 1993, MONTIUN *et al.*, 1994; BROWN *et al.*, 1999). Nur wenige weitere chromosomenspezifische repetitive Sequenzen sind allerdings bisher in pflanzlichen Genomen identifiziert worden (WANG *et al.* 1995, GAO *et al.*, 2000, UENG *et al.*, 2000). Daher wurden Repeats eingesetzt, die in unterschiedlichen Kopienanzahl auf den Chromosomen vorhanden sind. Eine übereinstimmende chromosomale Position und gleiche Fluoreszenzintensität der Hybridisierungssignale kann dann zur Identifizierung homologer Chromosomen führen. Durch *in situ*-Hybridisierung von Mikrosatelliten (CUADRADO & SCHWARZACHER, 1998); Satellitenrepeats (PEDERSEN *et al.*, 1996; GALASSO *et al.*, 2001) oder Retrotransposons (HESLOP-HARRISON *et al.*, 1997; PRESTING *et al.*, 1998) wurden bereits differenzielle Hybridisierungsmuster auf pflanzlichen Chromosomen erzeugt.

Auf den morphologisch sehr ähnlichen Chromosomen von *B. vulgaris* wurden in den eigenen Arbeiten mehrere unterschiedliche Repeatfamilien durch *multi-colour* FISH-Experimente und Rehybridisierungen simultan lokalisiert. Durch Kombination der Signalverteilungsmuster ist eine Identifizierung von sechs individuellen Chromosomen und einer weiteren Gruppe mit drei Chromosomen möglich.

Um eine weiteren Differenzierung der *B. vulgaris*-Chromosomen durchzuführen, scheint die Kombination der ermittelten Hybridisierungsmotive mit Signalmustern von Mikrosatellitensequenzen oder LINEs sinnvoll (SCHMIDT *et al.*, 1993; KUBIS *et al.*, 1997). Sowohl Mikrosatelliten als auch LINEs sind dispers über alle Chromosomen verteilt und bilden auf einigen Chromosomen Cluster oder Sequenzblöcke, die einzelne stärkere Signale verursachen. Da meist nur zwei oder drei Sonden simultan hybridisiert werden können, ist zu bedenken, dass eine Analyse und Kombination der Hybridisierungssignalmuster von mehreren Repeatfamilien sehr aufwendig sein kann. Durch Rehybridisierung der Chromosomenpräparate kann die Anzahl der hybridisierten und lokalisierten DNA-Sequenzen erhöht werden. Allerdings nimmt die Qualität der

Chromosomenpräparate nach Rehybridisierung stark ab und die Detektion und Positionierung der Signale ist häufig sehr erschwert.

Vorteilhafter wäre eine Karyotypisierung mit chromosomenspezifischen DNA-Sequenzen, die sich durch ihre Markierung oder durch eine chromosomenspezifische Position unterscheiden und simultan eingesetzt werden können.

In tierischem oder humanem Kernmaterial ist eine routinemäßige Karyotypanalyse durch FISH möglich. Als DNA-Sonde werden Gemische aus DNA-Fragmenten verwendet, die spezifisch an ein bestimmtes Chromosom hybridisieren. Solche DNA-Sonden werden beispielsweise nach der Sortierung von Chromosomen hergestellt, in dem aus der präparierten DNA eine chromosomenspezifische DNA-Bibliothek angelegt wird (*painting probes*). Die Sortierung erfolgt mit Durchflusszytometrie (*flow-sorter*) oder durch Mikrodisektion. Dieses Verfahren wurde erstmal 1988 von LICHTER *et al.* sowie PINKEL *et al.* vorgestellt. In pflanzlichem Material ist durch den hohen Anteil von dispers im Genom verteilten Genomkomponenten (zumeist Retrotransposons), das sogenannte *chromosome painting* durch ein Gemisch von chromosomenspezifischen DNA-Fragmenten nur eingeschränkt möglich. Pflanzliche Chromosomen besitzen ein ähnliches AT/GT-Verhältnis auf allen Chromosomen, was auf ausgedehnte Sequenzhomogenisierung durch häufige Transposition und / oder Konversion im Genom hinweist (SCHUBERT *et al.*, 2001), und die Isolierung von chromosomenspezifischen Sequenzen sehr erschwert. DNA-Sonden, die nach Mikrodisektion individuellen pflanzlichen Chromosomen aus *Vicia faba*, *Hordeum vulgare*, *Triticum aestivum* oder *Picea abies* isoliert wurden, zeigten unabhängig von angewendeten Blockierungsbedingungen Hybridisierungssignale auf allen Chromosomen (FUCHS *et al.*, 1996a). Nur in wenigen Ausnahmen wurden nach Mikrodisektion chromosomenspezifische Repeats isoliert. In *Rumex acetosa* konnten beispielsweise erfolgreich Repeat durch Mikrodisektion isoliert werden, die spezifisch an das Y-Chromosome hybridisieren (SHIBATE *et al.*, 1999).

Die Entwicklung von BAC und YAC-Bibliotheken mit genomischen Insertionen erlaubt die Isolierung von Klonen, die als Markersequenzen individueller Chromosomen eingesetzt werden können. Die Wahrscheinlichkeit, dass die genomische Insertion der YACs oder BACS dispers lokalisierte Retrotransposonssequenzen beinhaltet, steigt proportional zum Anteil der repetitiven Sequenzen am Genom und zur Größe der Insertion. An Chromosomen von *A. thaliana*, deren Genom einen geringen Anteil von dispers lokalisierten Genomkomponenten besitzt, konnte *chromosome painting* mit einem

Gemisch aus chromosomenspezifischen BAC-Klonen erfolgreich durchgeführt werden (LYSAK *et al.*, 2001).

Durch Lokalisierung von Markersequenzen auf individuellen Chromosomen ist eine Integration von physikalischen Chromosomenkarten zu genetischen Kopplungsgruppen möglich.

Ziel weiterer Karyogrammanalysen sollte daher der Einsatz von chromosomenspezifischen unikalen Sequenzen z.B. BACs sein. Beispielsweise könnten RFLP-Proben, die aus den genetischen Kopplungsgruppen von *B. vulgaris* ausgewählt wurden, zum Sichten einer BAC-Bibliothek von *B. vulgaris* eingesetzt werden. Wenn die Insertionen der isolierten BACs frei von dispers lokalisierten Repeats sind, sollten die BACs zur Identifizierung von Chromosomen geeignet sein und so zu einer Integration von genetischer Kopplungsgruppe und physikalischer Chromosomenkarte beitragen können.

4.5. Einsatz der FISH in der Pflanzenzüchtungsforschung: Analyse der Genome von nematodenresistenten Zuckerrübenlinien

4.5.1. Genomische-*in situ*-Hybridisierung zur Bestimmung der Genomzusammensetzung

Die Genomische-*in situ*-Hybridisierung (GISH), bei der als DNA-Sonde die genomische Gesamt-DNA (Genomsonde) einer Elternart verwendet wird, eignet sich zur Identifizierung einzelner Chromosomen, Chromosomensegmente (SCHWARZACHER *et al.*, 1992) oder vollständiger Genome in Hybridlinien und natürlichen Arthybriden (SCHWARZACHER *et al.*, 1989; ANAMTHAWAT-JÓNSSON *et al.*, 1990, ANAMTHAWAT-JONSSON, 2001, FORSSTROM *et al.*, 2002). Die GISH kann daher sowohl in der Pflanzenzüchtung zur Genomanalyse von Hybridpflanzen aus Artkreuzungen und anschließenden Rückkreuzungen eingesetzt werden als auch zur taxonomischen Einordnung von natürlichen allopolyploiden Pflanzen beitragen (ØRGAARD *et al.*; 1995, FUKUI *et al.*, 1997). Die Bestimmung der Genomzusammensetzung in Krokus (*Crocus*; Iridaceae) (ØRGAARD *et al.*; 1995), Weizenhybriden (*Triticum durum* x *T. distichum* x *Lophopysum elongatum*) (KOSINA & HESLOP-HARRISON, 1996), Reis (*Oryza*) (FUKUI *et al.*, 1997) oder Kartoffel (*Solanum tuberosum*) (DONG *et al.*, 1999) erfolgte beispielsweise durch GISH. Der Nachweis von relativ kleinen Translokation durch GISH wurde durch MUKAI *et al.* (1993) in Weizen-Reis-Hybriden und durch PICKERING *et al.* (2000) in Gerstenhybriden (*Hordeum bulbosum* x *H. vulgare*) beschrieben. In den eigenen Studien wurden Hybridgenome von nematodenresistenten Zuckerrübelinien durch Genomische-*in situ*-Hybridisierung (GISH) analysiert (DESEL *et al.*, 2002).

Durch interspezifischen Kreuzungen zwischen *B. vulgaris* und *B. procumbens* und mehrfacher Rückkreuzung mit *B. vulgaris* konnten nematodenresistente monosome Additionslinien und Fragmentadditionslinien entwickelt werden, die ein zusätzliches Chromosom oder ein Chromosomenfragment aus *B. procumbens* zum Zuckerrüben genom enthalten (JUNG & WRICKE, 1987). Weiterhin entstanden nematodenresistente Translokationlinien, bei denen Wildrübenchromatin in ein Zuckerrübenchromosom integriert wurde (JUNG *et al.*, 1992). Durch Genomische-*in situ*-Hybridisierung wurde das zusätzliche Wildrübenchromosomen oder -chromosomenfragment im Genom der monosomen Additionslinie und der Fragmentadditionslinie detektiert und identifiziert. Auf Chromosomen der Translokationslinie A906001 war es möglich, die integrierte Wildrüben-DNA von ungefähr 1Mb durch Einsatz von genomischer DNA als Sonde zu lokalisieren.

Obwohl eine Kreuzhybridisierung der markierten Genomsonden mit konservierten Sequenzen nicht durch zusätzliche Blockierungsreaktionen oder Konkurrenz (durch Zusatz von C_0t -1-DNA) unterdrückt wurde (CAMILLERI *et al.*, 1998), war eine eindeutig Zuordnung der Signale möglich. Auch eine Vorhybridisierung der Sonden mit genomischer DNA aus der im Hybridgenom vertretenen zweiten Elternart, war nicht erforderlich. Bei eng verwandten Arten war beispielsweise der Einsatz eines 100-500fachen Überschusses der Blockierungs-DNA zur Sonden-DNA notwendig (WANG *et al.*, 2000), um eine spezifische Hybridisierung an die Chromosomen einer Elternart zu detektieren. Die phylogenetische Distanz zwischen den Genomen der Elternarten aus den Sektionen *Beta* und *Procumbentes* ist demnach ausreichend groß für eine GISH-Analyse der Hybride (FRITSCHKE *et al.*, 1987). Dieses Ergebnis war zu erwarten, da molekulare Analysen der repetitiven Genomkomponenten auf relativ großen phylogenetischen Abstand der beiden *Beta*-Sektionen hindeuteten (SCHMIDT & HESLOP-HARRISON, 1996; SCHMIDT *et al.*, 1990; 1996; 1997). Trotzdem ist bemerkenswert, dass eine eindeutige differentielle Markierung der Elternanteile in den Hybridgenomen möglich ist, da zahlreiche repetitiven DNA-Sequenzen in beiden Elterngenomen vorkommen. Dazu zählen die ribosomalen Gene, Telomersequenzen und zwei Satellitenfamilien (*Eco*RI-Satellit pEV1 und *Apa*I-Satellit pAV34) sowie LTR-Retrotransposons und LINEs (SCHMIDT *et al.*, 1998; JANSEN, 1999; KUBIS *et al.*, 1998). Die in beiden Genomsonden enthaltenden hochkonservierte 18S-5,8S-25S rRNA-Gensequenzen verursachen starke terminale Signale auf Chromosom 1 von *B. vulgaris* (SCHMIDT *et al.*, 1994). Da es zu einer Überlagerung der optischen Signale beider Genomsonden kommt, erscheinen die durch Kreuzhybridisierung hervorgerufenen Signale in Mischfarben und sind von den durch reine Fluoreszenzfarben gekennzeichneten genom-spezifischen Signalen unterscheidbar.

In der Pflanzenzüchtung ist die Auslösung von Translokation im Genom von Arthybriden zur Übertragung von Genen einer Art auf eine andere Art von großer Bedeutung (HOFFMANN *et al.*, 1971). Die Introgression von DNA mit agronomisch wertvollen Gensequenzen aus einer Wildart in Chromosomen einer Kulturart, ist häufig Voraussetzung für eine korrekt ablaufende Meiose und die damit verbundene stabile Vererbung der eingekreuzten Merkmale. Nach Artkreuzungen werden Rückkreuzungen durchgeführt deren Ziel Pflanzen sind, die weitgehend dem rekurrentem Elter, der Kulturart, entsprechen und nur noch wenig Erbinformationen des Donors, der Wildart, enthalten (BECKER, 1993). Meist nur durch GISH ist eine eindeutige Identifizierung von wertvollen Hybridpflanzen möglich, in denen homoologe Chromosomen rekombiniert und

Chromosomenabschnitte transloziert sind (CRASTA *et al.*, 2000, WANG *et al.*, 2000). Ein Nachweis von integrierten kurzen DNA-Fragmenten ist besonders bedeutsam, da durch Methoden der klassischen Cytogenetik wie z. B. *banding*-Techniken an kleinen Chromosomen kleine Veränderungen in der Chromosomenstruktur nur schwer detektierbar sind. Wertvolle Hybridpflanzen mit minimalen Anteil an Erbinformation der Wildart können durch GISH selektiert werden. Die eindeutige Lokalisierung von ungefähr 1000 kb in verschiedenen meiotischen Stadien von *B. vulgaris* deutet darauf hin, dass GISH erfolgreich in der Genomanalyse von Translokationslinien der Gattung *Beta* eingesetzt werden kann.

Die Ergebnisse zeigten weiterhin, dass es möglich ist, durch Genomische-*in situ*-Hybridisierung, die in das Zuckerrübengenom integrierte Wildrüben-DNA im Hybridgenom über seine vollständige Länge zu markieren. Dies erlaubt eine Lokalisierung von weniger kondensierten, nicht separat liegenden Chromosomen in mitotischen und meiotischen Stadien, sowie in den wenig differenzierten Chromatinstrukturen der Interphase- und Prophasenuklei (SCHWARZACHER *et al.*, 1997; MIKHAILOVA *et al.*, 1998). Dadurch ist eine Voraussetzungen geschaffen, um Assoziation und Synapse homoeologer Chromosomen und Chromosomenfragmente während der Meiose zu analysieren. Die weitgehend noch unbekanntem Vorgänge in den frühen meiotischen Stadien können durch GISH-Studien untersucht werden. Beispielweise wurde GISH eingesetzt, um die Effekte des *Ph1*-Gens auf die Paarung homoeologer Chromosomen in Additionslinien aus Weizen und Reis zu untersuchen (MIKHAILOVA *et al.*, 1998). Der Nachweise einer Anlagerung von Chromosomen oder Chromosomenfragmenten aus der Wildrübe an teilweise homologe DNA in terminalen Chromosomenregionen der Zuckerrübe (wie z.B. subtelomerisches Repeat pAV34, JANSEN ,1999) durch GISH könnte auf Rekombinationsereignisse und Übertragung von Wildrübenegenen auf *B. vulgaris*-Chromosomen hinweisen. Gewonnene Kenntnisse über Rekombination-initiiierenden Chromsomenregionen könnten die Entwicklung von Strategien zur Integration von Fremd-DNA in Genome und zukünftig die Struktur artifizierlicher pflanzlicher Chromosomen beeinflussen. Im Diplotän und der Diakinese kann die Bildung von Bivalenten oder Trivalenten zwischen Chromosomen auf Sequenzhomologien zwischen parental Genomen deuten und zur taxonomischen Einordnung von Arten führen (POGGIO *et al.*, 1999).

Die Genomische-*in situ*-Hybridisierung erlaubt die Bestimmung der Zusammensetzung von Hybridgenomen, ohne zunächst genomspezifische Marker der Eltern Genome zu klonieren und molekular zu charakterisieren. Dies ist von besonderem Vorteil, wenn wenig

untersuchte Wildarten mit agronomisch wertvollen Eigenschaften in die Zuckerrübe eingekreuzt werden. Die erarbeiteten Verfahren wurden zur Analyse der Hybridgenome aus interspezifischen Kreuzungen von *B. vulgaris* und *B. corolliflora* aus der Sektion *Corollinea* eingesetzt. Die Differenzierung von monosomen Additionslinien und trisomen Linien, sowie die Identifizierung von amphitriploiden Hybriden war ohne vorherige Charakterisierung von *Corollinea*-spezifischen Markern möglich (JANSEN, 1999; DESEL *et al.*, 2002). Die Übertragbarkeit des Verfahrens und damit die Anwendung der GISH auf weitere Fragestellungen zur Komposition von Hybridgenomen innerhalb aller Sektionen der Gattung *Beta* scheint daher sehr wahrscheinlich.

4.5.2. Einsatz von *B. procumbens* spezifischen Satellitensequenzen zur Analyse von Zuckerrübenhybridlinien

Die drei Wildrübenarten [*B. procumbens* ($2n = 18$); *B. webbiana* ($2n = 18$); *B. patellaris* ($2n = 36$)] der Sektion *Procumbentes* wurden molekular und cytologisch intensiv untersucht (SCHMIDT *et al.*, 1990, 1994; SCHMIDT & HESLOP-HARRISON, 1993; 1996). Aufgrund der in ihnen gefundenen vollständigen und dominant vererbten Resistenz gegen den bedeutenden Schädling der Zuckerrübe, den Rübenzystennematode *Heterodera schachtii*, ist die Genomanalyse der *Procumbentes*-Arten für die Pflanzenzüchtung von großer Bedeutung. Prominente Satelliten-DNA-Familien, die nur in den Genomen der *Procumbentes*-Arten vorliegen, konnten identifiziert werden (SCHMIDT *et al.*, 1990, 1996). Die charakterisierten *Sau3AI*-Satellitenrepeats pTS5 wurden zur Selektion von resistenten, monosomen Additionslinien (18+1) und zum Nachweis von *B. procumbens* Chromatin im Hybridgenom mittels Squash-Dot-Hybridisierung oder Dot-Blot-Hybridisierung eingesetzt (SCHMIDT *et al.*, 1990). Durch FISH konnte gezeigt werden, dass zwei nicht homologe *Sau3AI*-Satellitenfamilien mit unterschiedlichen in centromerischen Chromosomenregionen von *B. procumbens* und *B. patellaris* lokalisiert sind. Repeatblöcke der *Sau3AI*-Satellitensequenz pTS5 wurden auf 10-12 Chromosomen in *B. procumbens* und 22-24 Chromosomen in *B. patellaris* detektiert. Für Repeats des nicht-homologen und ebenfalls pericentromerisch lokalisierten *Sau3A*-Satelliten pTS4.1 wurden 16 Loci im Genom von *B. procumbens* und 26 Loci in *B. patellaris* durch *multi-colour* FISH nachgewiesen. Die tetraploide *B. patellaris* ist eine Allopolyploide, die *B. procumbens* als ein Elterngenom besitzt. Das zweite Elterngenom ist unbekannt. Durch *in situ*-Hybridisierung von genomischer DNA aus *B. procumbens* konnte gezeigt werden, dass das zweite Elterngenom von einer nah verwandten Art abstammt (STEFFENSEN, 1997). Die

Chromosomen des zweiten Elterngenoms wurden durch die Gesamt-DNA von *B. procumbens* vollständig, aber in einer geringeren Intensität markiert. Die Anzahl der pTS5-Loci scheinen in beiden Elterngenomen nahezu gleich. Die pTS4.1-Satellitensequenz dagegen ist auf dem zweiten unbekanntem Subgenom weniger hoch amplifiziert und daher im Verhältnis zum *B. procumbens*-Genom nicht in doppelter Locianzahl in *B. patellaris* nachweisbar. Die sehr differierenden Fluoreszenzintensitäten der Signale auf den Chromosomen weisen auf eine unterschiedlich starke Amplifikation der *Sau3AI*-Satellitenrepeats in den centromerischen Chromosomenregionen hin. Um so erstaunlicher ist, dass das Wildrübenchromosomen in allen nematodenresistenten monosomen Additionslinien durch FISH der pericentromerisch lokalisierten *Sau3AI*-Satellitenrepeats durch ein starkes Fluoreszenzsignal zu identifizieren ist. DNA-Sonden beider *Sau3AI*-Satellitenfamilien sind daher auf allen Wildrübenchromosomen, auf denen das Nematodenresistenzgen lokalisiert ist, hoch amplifiziert (SCHMIDT *et al.*, 1990). Auch die Minichromosomen der nematodenresistenten Fragmentadditionslinien PRO1 und PAT2 können durch FISH der *Sau3AI*-Satelliten identifiziert werden (SCHMIDT *et al.*, 1997).

4.5.3. Möglicher Entstehungsprozess der Fragmentadditionslinien PRO1 und PAT2

DNA-Sonden der *Sau3AI*-Satellitenfamilien aus *B. procumbens* hybridisieren an den addierten Chromosomenfragmenten der Fragmentadditionslinien PRO1 und PAT2 von *B. vulgaris* (SCHMIDT *et al.*, 1997). In der Linie PRO1 ist ein starkes Hybridisierungssignal der centromerassoziierten Sequenzen am Fragmentende zu beobachten. Das Fragment, das von einem Chromosom der Wildrübe *B. procumbens* stammt, ist demnach akrozentrisch. Vergleichende Untersuchungen von meiotischen Chromosomen und Chromatinfasern von *B. procumbens* und PRO1 deuten darauf hin, dass ein Bruch innerhalb der centromerisch lokalisierten pTS5-Sequenzen im Wildrübenchromosom zur Entstehung des Fragments in PRO1 geführt haben muss. Der Bruch führte zu einem Verlust einer flankierenden pTS4.1-Region. Die unterschiedliche Organisation der *Sau3AI*-Satelliten in *B. procumbens* und PRO1 sind in Abb. 25 vergleichend dargestellt (GINDULLIS *et al.*, 2001).

Die in *B. procumbens* centromernah lokalisierte *EcoRI*-Satellitensequenz (pEV1) wurde auf dem Chromosomenfragment nachgewiesen. *In situ*-Hybridisierungen an Pachytänchromosomen zeigten, dass pEV1-Repeats und pTS5-Repeats am gleichen Fragmentende lokalisiert sind. Die in *B. procumbens* pericentromerisch detektierten Ty3-gypsy-Retroelemente (pBp10) hybridisierten ebenfalls spezifisch an einem Ende des addierten Chromosomenfragments. Große pTS5-Satellitenblöcke werden wahrscheinlich,

wie auch schon in der pericentromerischen Region von *B. procumbens* beobachtet, von kleineren Blöcken der Ty3-gypsy-Retroelemente unterbrochen. Die beobachtete Organisation der beiden Satellitenfamilien und der Ty3-gypsy-Retrotransposons scheint ein allgemeines Prinzip der Centromerregion in *B. procumbens* zu sein, das auch durch die Addition eines Chromosomenfragments in ein Zuckerrüben genom nicht verändert wird.

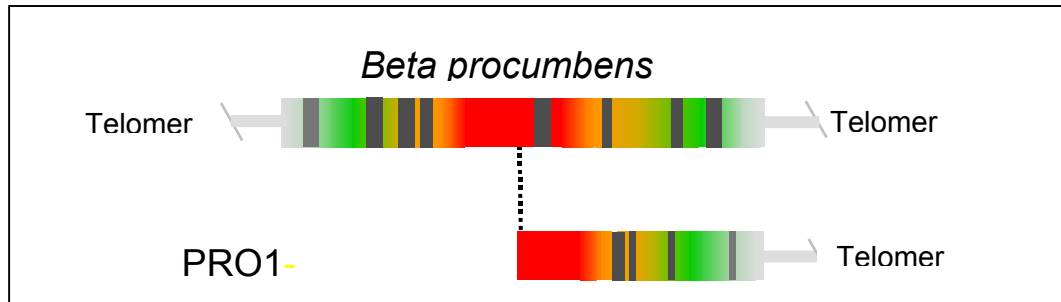


Abb. 24: Modell der Entstehung des PRO1-Chromosomenfragments (nach GINDULLIS *et al.*, 2001). Die Lage des vermutlichen Bruchpunkts im Centromer (rot) ist durch die senkrechte Linie gekennzeichnet. pTS5-Repeats (rot) sind zentral lokalisiert und flankiert von pTS4.1-Regionen (grün). Überlappende Bereiche sind orange markiert. Unterbrochen werden die Satelliten durch kurze Regionen komplexer DNA-Sequenzen wie z.B. Ty3-gypsy-ähnliche Retroelemente (grau).

Eine 100%ige Weitergabe des Chromosomenfragments in der Mitose und 34,8%ige Transmission in der Meiose (BRANDES *et al.*, 1987; 1992) weisen auf das Vorhandensein von funktionellen centromerischen Strukturen, die für die mitotischen Teilungsprozess aber nicht immer für die Meiose genügen. Die eingeschränkte centromerische Aktivität des Chromosomenfragments in der Meiose könnte durch das Fehlen einer symmetrisch aufgebauten Centromerregion, oder durch die verminderte Länge des centromerischen Chromosomenbereichs verursacht werden. Denkbar ist, dass insbesondere bei der Paarung der homologen Chromosomen Störungen auftreten, die zum Verlust des einzeln vorliegenden Chromosomenfragments führen. Es wurde häufig beobachtet, dass das Fragment eng benachbart zur terminalen Chromosomenregion eines Bivalent lokalisiert ist. Da das Chromosomenfragment keinen homologen Partner besitzt, könnte die Anlagerung an einen Chromosomenabschnitt eines Bivalent mit möglichst hoher Homologie, Voraussetzung für eine korrekt Verteilung auf ein Tochterkern darstellen.

Erste Untersuchungen der Fragmentadditionslinie PAT2, die nach Artkreuzungen von *B. vulgaris* und *B. patellaris* selektiert wurde (BRANDES *et al.*, 1987), lassen einen anderen Aufbau des Fragments und einen von PRO1 differierenden Entstehungsprozess vermuten. Durch FISH wurde gezeigt, dass die Loci der *Sau3AI*-Satelliten nicht am Fragmentende liegen. Die *Sau3AI*-Satellitenrepeats pTS4.1 scheinen wie bei einem

vollständigen Centromer in zwei Blöcken angeordnet zu sein. Allerdings flankieren die pTS5-Repeats nicht wie in PRO1 die pTS4.1-Sequenzblöcke auf einer Seite. Die *in situ*-Hybridisierung an gestreckten Chromatinfasern deutet vielmehr auf eine Interspersion der pTS4.1 und pTS5-Repeats in beiden Blöcken hin. Das PAT2-Fragment könnte demnach durch zwei Brüche in interkalärer Chromosomenregion beider Chromosomenarme entstanden sein. Die möglichen Bruchstellen müssten in sehr unterschiedlicher Distanz zum Centromer lokalisiert sein. Daher scheint eine Entstehung durch einen Bruch innerhalb des langen Arms eines submetazentrischen *B. patellaris*-Chromosoms wahrscheinlich. Zu vermuten ist, dass das ursprüngliche Wildrübenchromosom wie auch das Fragment durch schwach DAPI-gefärbtes Heterochromatin und einen niedrigen Amplifikationsgrad der pTS5-Repeats charakterisiert ist. Im Genom von *B. patellaris* lässt sich anhand dieser Kriterien ein Chromosomenpaar erkennen, aus dem das PAT2-Fragment abstammen könnte. Dies Chromosom ist submetazentrisch, zeigt schwach DAPI-gefärbtes Heterochromatin und ein pTS5-Signal von geringer Intensität.

Für einen eindeutigen Nachweis wäre eine vergleichende Hybridisierung von PAT2-Chromosomenfragment-spezifischen Markern auf der Fragmentadditionslinie und der Elternart *B. patellaris* notwendig. Grundlage für weitere Studien an PAT2 scheint eine BAC-Bibliothek des PAT2-Genoms, mit deren Hilfe Fragment-spezifische BAC isoliert, charakterisiert und lokalisiert werden können.

Ziel weiterer Studien sollte eine physikalische Feinkartierung der Fragmente in PAT2 als auch in PRO1 durch molekulare und cytogenetische Verfahren sein. Vergleichende Untersuchungen in den Elternarten könnten zu Erkenntnissen zum Entstehungsprozess und zur chromosomalen Herkunft der Fragmente führen.

4.5.4. Physikalische Kartierung der Wildrübentranslokation in der Zuckerrübenlinie A906001

In der Nachkommenschaft von monosomen Additionslinien konnten nematodenresistente Translokationslinien, das sind 18-chromosomige Zuckerrübenlinien mit einer Introgression der Wildrübe *B. procumbens*, selektiert werden. Da sie relativ geringe Mengen an Wildrüben-DNA enthalten und daher im Vergleich zu monosomen Additionslinien und Fragmentadditionslinien nur wenige agronomisch unerwünschte Wildrübeneigenschaften besitzen, sind sie von hohem züchterischen Interesse. Durch Selbstung entstand die homozygote Translokationslinie A906001 (Kielcode 930043), die eine Wildrübentranslokation von ungefähr 1 Mb enthält. Aus der Linie A906001 wurde eine

repräsentative YAC-Bank erstellt, aus der translokationsspezifische YAC-Klone isoliert werden konnten (KLEINE *et al.* 1993; CAI *et al.*, 1996). Diese YAC-Klone wurden zum Sichten einer cDNA-Bank aus der Wurzel eingesetzt und ein cDNA-Klon (Klon 1832) konnte isoliert werden, der wie genetische Komplementationsversuche zeigten, das *HsI^{pro-1}*-Gen repräsentiert (CAI *et al.*, 1997). Im Genom von *B. procumbens* sind 3 Nematodenresistenzgene (*HsI^{pro-1}*, *Hs2^{pro-7}*, *Hs3^{pro-8}*) auf 3 verschiedenen Chromosomen (I, VII, VIII) nachgewiesen worden (LÖPTIEN, 1984; REAMON-RAMOS & WRICKE, 1992; LANGE *et al.*, 1993; KLEINE *et al.*, 1997). Durch RFLP- und AFLP-Kartierung wurde das Resistenzgen *HsI^{pro-1}* des Chromosoms 1 von *B. procumbens* endständig auf Kopplungsgruppe 4 der Translokationslinie A906001 lokalisiert (HELLER *et al.*, 1996; SCHONDELMEIER & JUNG, 1997).

Durch Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung mit den von CAI *et al.* (1996) und KLEINE *et al.* (1993) isolierten translokationsspezifischen YACs wurde die endständige Position der Translokation durch direkten mikroskopischen Nachweis auf den Chromosomen bestätigt. Der YAC120, der die Sequenz des Nematodenresistenzgens *HsI^{pro-1}* enthält, sowie der YAC128 konnten in terminaler Chromosomenregion auf zwei homologen Chromosomen nachgewiesen werden. YAC120 und YAC128 sind Bestandteile zweier nicht überlappender Contigs, die auf Grundlage molekularer Analysen aufgestellt wurden und die Anordnung bekannter Sequenzen auf der Translokation repräsentieren (CAI *et al.*, 1996). Durch Doppelhybridisierung beider YACs an langgestreckten meiotischen Chromosomen wurde der YAC120 distal und der YAC128 proximal lokalisiert. Daraus folgernd konnte die Orientierung der Contigs und ihre Ausrichtung auf der Translokation bezüglich zum Telomer oder Centromer bestimmt werden. Durch RFLP- oder AFLP-Kartierung war eine Ausrichtung der Sequenzkarte bisher nicht möglich. Weiterhin zeigte die detailliertere Analyse des distalen Chromosomenabschnittes, durch *multi-colour* FISH des telomerischen Repeats pLT11 und des YAC120 an dekondensierten Pachytänchromosomen, dass die Translokation durch telomerische Repeats abgeschlossen wird.

Um das Resistenzgen *HsI^{pro-1}* durch FISH direkt nachzuweisen, wurden DNA-Sonden unterschiedlicher Länge hergestellt. Nur die kürzeste DNA-Sonde mit einer Sequenzlänge von nur 684 bp hybridisierte hochspezifisch und terminal an einem Chromosomenpaar. Die längeren DNA-Sonden zeigten zusätzliche terminale Hybridisierungssignale, die vermutlich durch Kreuzhybridisierung mit konservierten Sequenz-Motiven verursacht werden. Denkbar wäre, dass DNA-Regionen für die zusätzlichen Hybridisierungssignale

verantwortlich sein könnten, die für die auch in anderen Genen vorkommenden lysinreiche Domäne kodieren. Weiterhin zeigten molekulare Analysen (Southern- und Northern-Hybridisierungen), dass dem Nematodenresistenzgen *HsI^{pro-1}* homologe DNA-Sequenzen mit bisher unbekannter Funktion im Genom von *B. vulgaris* vorhanden sind (D. CAI persönliche Mitteilung). Nur durch hoch stringente Versuchsbedingungen ist ein spezifischer Nachweis des *HsI^{pro-1}*-Gens möglich. Dies bestätigt die Ergebnisse, die durch FISH mit der *HsI^{pro-1}*-Sequenz als DNA-Sonde erhalten wurden.

Durch die Lokalisierung des Nematodenresistenzgens *HsI^{pro-1}* im Genom der Translokationslinie A906001 wurde erstmalig eine unikale Gensequenz durch FISH-Experimente in *B. vulgaris* detektiert. Dadurch wurden die Grundlagen weiterer Genlokalisierungen im Genom der Zuckerrübe durch Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung geschaffen. Durch den Einsatz der kurzen unikalen DNA-Sequenz wurde die Nachweisgrenze unikalere Sequenzen durch FISH in der pflanzlichen Genomanalyse auf 684 bp gesenkt.

4.5.5. Mögliche Entstehung und Herkunft der Translokation

Um einen Hinweis auf den möglichen Entstehungsprozess der Translokation und auf die Herkunft der integrierten DNA mit dem *HsI^{pro-1}*- Nematodenresistenzgen zu erhalten, wurden vergleichende *in situ*-Hybridisierungen an Chromosomen der monosomen Additionslinie und der Wildrübe *B. procumbens* durchgeführt.

FISH der internen Gensequenz zeigte, dass das Nematodenresistenzgen auf dem addierten Wildrübenchromosom der Additionslinie wie auch in der Wildrübe endständig lokalisiert ist. Daraus folgt, dass das Resistenzgen nach *crossing over* der terminalen Regionen eines Wildrüben- und Zuckerrübenchromosoms und Übertragung und Introgression des endständigen Wildrübenchromosomenabschnittes in das Genom von *B. vulgaris* integriert wurde. Die terminale Chromosomenregion, in der es bevorzugt zu einer Wildrübenintrogression kommt, kann als ein *Hot spot* für Translokationen bezeichnet werden (HELLER *et al.*, 1996). Dennoch bleibt fraglich, ob es sich um reziproke Translokationsereignisse handelt. Die Hybridisierung markierter cDNA an *B. vulgaris*-Chromosomen ergab, dass genreiche DNA-Sequenzen vorwiegend im subtelomerischen Euchromatin zu finden sind (SCHMIDT & HESLOP-HARRISON, 1998). Es ist kaum anzunehmen, dass *B. vulgaris* als diploide Pflanze den mit einer reziproken Translokation einhergehenden Genverlust tolerieren kann. Vielmehr muss davon ausgegangen werden, dass das *B. procumbens*-Chromosomensegment an ein Chromosom der Zuckerrübe

angelagert wurde. In weiterführenden Arbeiten könnte untersucht werden, ob durch die Translokation auch die Struktur des Telomerbereichs und des Blocks des subtelomerischen Satelliten pAV34 (JANSEN, 1999) verändert wurde.

4.5.6. Ursache für die verminderte Transmission in nematodenresistenten Translokationslinien von *B. vulgaris*

Der Anteil anfälliger Pflanzen in nematodenresistenten Zuckerrübenlinien hat erheblichen Einfluss auf die Abundanzdynamik von *H. schachtii* unter Feldbedingungen (MÜLLER, pers. Mitteilung). Nematodenzysten, die bis zu zehn Jahren im Boden überdauern können, sich durch Befall von anfälligen Pflanzen stark vermehren. Die Erfassung der Ursache für die verminderte Vererbung der Resistenz ist notwendig, um Strategien zur Verbesserung der resistenten Zuckerrübensorten zu entwickeln. Es wurde vermutet, dass besonders aggressive Pathotypen (z.B. Schach 1) der *H. schachtii*-Populationen im Feld spezifisch die Resistenz des eingekreuzte *HsI^{pro-1}*-Gens durchbrechen können. Diese Pathotypen sollen verantwortlich für das Auftreten von ca. 5% anfälliger Pflanzen in der Nachkommenschaft der homozygot resistenten Bestäuberlinie sein (MÜLLER, persönliche Mitteilung). Weiterhin zeigten cytologische Beobachtungen Unregelmäßigkeiten der Chromosomensegregation innerhalb der Meiose (BRANDES *et al.*, 1987). Da die translokationstragenden Chromosomen mikroskopisch nicht eindeutig nachweisbar sind, konnte allerdings durch klassische cytologische Studien nicht geklärt werden, ob die Translokation an den beobachteten Strukturen beteiligt war. Nur der Einsatz von translokationsspezifischen Sonden in FISH-Experimenten ermöglichte, die Wildrübenintrogression in meiotischen Chromosomenstadien zu lokalisieren. Durch FISH des translokationsspezifischen YAC128 in verschiedenen meiotischen Teilungsstadien konnte gezeigt werden, dass die Erkennung und Paarung homologer Chromosomen in meiotischen Prophasen durch das integrierte Wildrübenchromatin nicht behindert werden. Diese Beobachtungen wurden durch GISH an meiotischen Prophasechromosomen bestätigt. In Zygotän und Pachytän wurde eine Assoziation und Paarung durch genomische DNA von *B. procumbens* markierten Translokation nachgewiesen.

In den folgenden meiotischen Stadien, der Diakinese, Anaphase und Telophase, wurden Störungen der Chromosomenaufteilung beobachtet, die auf einen Verlust der Wildrübenintrogression und somit des Nematodenresistenzgens *HsI^{pro-1}* bei der Gametenentwicklung hinweisen. Unregelmäßigkeiten innerhalb der meiotischen Verteilungsprozesse traten mit einer Häufigkeit von 5-16 % innerhalb der untersuchten

Zellen auf. Aufgrund der hohen Häufigkeit scheinen die durch die meiotischen Störungen hervorgerufenen Verluste von resistenzgetragenden Chromosomensegmenten einen bedeutenden Anteil am Verlust der Resistenz in der Nachkommenschaft zu besitzen. Ein Verlust der Resistenz bei etwa 5 % der Nachkommen, scheint daher im Wesentlichen durch den Verlust des Resistenzgens während der meiotischen Prozesse und nur zu einem geringen Anteil durch das Auftreten von aggressiven Pathotypen des Nematoden verursacht zu werden

Als Ursache für die Instabilität der Translokation lässt sich die folgende Annahme postulieren: Sowohl *B. vulgaris* als auch *B. procumbens* besitzen im subtelomerischen Bereich große Arrays des Satelliten pAV34 (JANSEN, 1999). Diese Blöcke haben eine Ausdehnung von 70-230 kb. Wenn die Translokation nicht reziprok ist, wovon aufgrund des nicht-tolerierbaren Genverlusts in *B. vulgaris* im Fall reziproker Translokation ausgegangen werden kann, muss bei der Entstehung der Translokation die Anlagerung eines terminalen *B. procumbens*-Chromosomenfragments angenommen werden. Die vergleichende Genlokalisierung durch FISH hat gezeigt, dass das Nematodenresistenzgen *HsI^{pro-1}* sich in terminaler Position in *B. procumbens* befindet. Nach Anlagerung der Wildrüben-translokation kommt es zur Ausbildung eines „chimären“ Zuckerrübenchromosoms, das nun einen proximalen, aus *B. vulgaris* stammenden pAV34-Satellitenblock und einen distalen, aus *B. procumbens* stammenden Satellitenblock besitzt. Wenn zwischen den beiden homologen Satellitenblöcken dieses Chromosoms während mitotischer Teilungsphasen oder der Interphase eine parazentrische Inversion erfolgt, so wird auch das Nematodenresistenzgen betroffen.

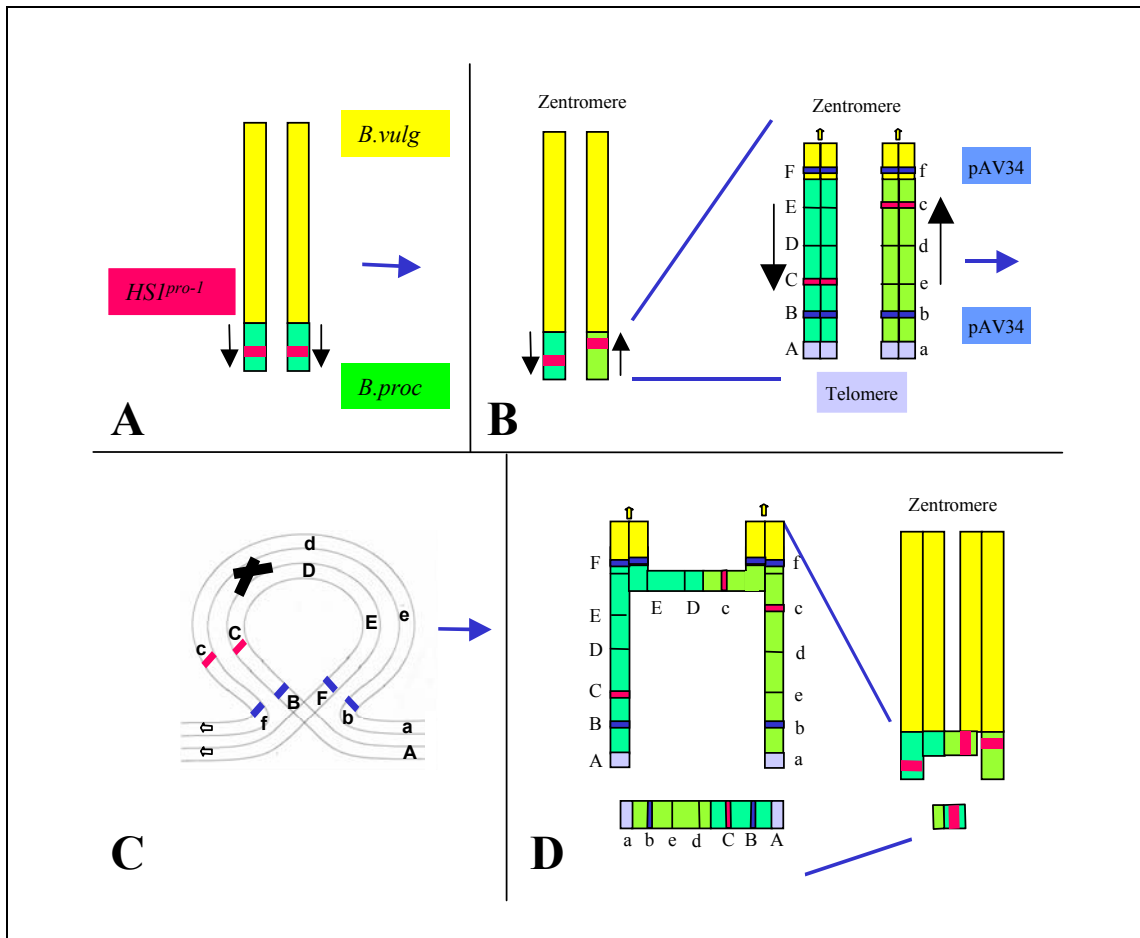


Abb. 25: Möglicher Mechanismus, der zum Verlust des Resistenzgens in der Translokationslinie führt. (A): Strukturheterozygote nach parazentrischer Inversion. (B): Bildung einer Inversionsschleife bei der Paarung der homologen Chromosomen sowie *crossing over* der beiden inneren, benachbarten Chromatiden zwischen c/c und d/D-Loci. (C) Brückenbildung und Chromosomenfragment nach erfolgter Rekombination und nach Auseinanderweichen der homologen Chromosomen in der ersten meiotischen Teilungsphase. F/f und B/b: homologe Satelliten; A/a: telomerische Repeats; C/c: z.B. Nematodenresistenzgen.

In der Meiose entstehen durch diese strukturheterozygoten Abschnitte der Chromosomen Inversionsschleifen. Sie können nach erfolgter Rekombination in den meiotischen Teilungen Brückenbildungen mit anschließenden Chromosomenbrüchen und Chromatinverlusten verursachen. Die Rekombination könnte wiederum durch *crossing over*-Ereignisse in den Satellitenblöcken ausgelöst werden. Nach Auseinanderweichen der homologen Chromosomen und Aufteilung auf die Tochterkerne entstehen Minichromosomen oder Chromosomenfragmente, die nicht zu den Polen transportiert werden und bei der Bildung der Kernmembran verloren gehen.

Multi-colour FISH-Analysen an meiotischen Stadien in denen als Sonden der YAC128 und das Satellitenrepeat pAV34 verwendet werden, könnten Aufschluss über ein solches Ereignis geben. Durch Untersuchungen des synaptischen Komplexes im Pachytänstadium und der Nachweis von Inversionsschleifen könnten weiterhin die dargestellten Vermutungen bestätigt werden. Die Lokalisierung der Translokation durch Nachweis des YAC128 in Präparationen des synaptischen Komplex durch Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung sollte in nachfolgenden Arbeiten durchgeführt werden. Da durch PETERSON *et al.* (1999) bereits unikaler Sequenzen durch FISH im synaptischen Komplex lokalisiert wurden, ist zu vermuten, dass derartige Studien erfolgreich durchführbar sind.

Die bereits vorliegenden Daten konnte zeigen, dass die verminderte Transmission der Nematodenresistenz in den resistenten Linie A906001 sehr wahrscheinlich durch die häufig auftretenden meiotischen Unregelmäßigkeiten, an denen die Translokation beteiligt ist, verursacht wird. Ein möglicher Mechanismus für die den Verlust des terminalen Chromosomenabschnitten nach Anlagerung einer Wildrüben-translokation wurde aufgezeigt.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Beitrag zur Analyse der Genomstruktur, Genomorganisation und –zusammensetzung von nematodenresistenten Zuckerrüben (*Beta vulgaris*) geleistet. Diese Linien enthalten ein vollständiges Zuckerrübengenom und addierte Chromosomen, Chromosomenfragmente oder Translokationen der Wildrübe *Beta procumbens* mit Resistenzgenen gegen den Rübenzystennematoden *Heterodera schachtii* Schm. Durch das molekular cytogenetische Verfahren der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung wurde der strukturelle Aufbau der Chromosomen in diesen Linien untersucht. Zunächst wurden die Wildrübenchromosomen, Chromosomenfragmente oder die Translokation (ca. 1Mb) im Zuckerrübengenom durch Genomische-*in situ*-Hybridisierung (GISH) und durch Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) mit genomspezifischen repetitiven DNA-Sonden identifiziert und chromosomal lokalisiert. Die strukturelle Analyse der Chromosomenfragmente in den Linien PRO1 und PAT2 erforderte vorab die Lokalisierung der DNA-Sonden in den Elterngenomen von *B. vulgaris* und *B. procumbens*. Dabei führte die Kombination der Hybridisierungsmotive der telomerischen, interkalaren und pericentromerischen Satellitenrepeats im Genom der Zuckerrübe zur eindeutigen Charakterisierung von sechs der insgesamt neun Chromosomenpaare. Grundlegend für die Karyotypanalyse waren FISH-Studien an dekondensierten meiotischen Chromosomenstadien. Durch die Darstellung der vollständigen Meiose in *B. vulgaris* wurde eine klare Charakterisierung der Teilungsstadien ermöglicht. Dies trug zu einem erfolgreichen Einsatz meiotischer Chromosomen in den FISH und damit verbunden zu einer Steigerung des Auflösungsvermögens der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung bei.

Die Etablierung des Verfahrens der *fibres*-FISH erlaubte eine hochauflösende Analyse der Anordnung repetitiver Sequenzklassen an den Chromosomenenden und in der centromernahen Chromosomenregion. Variable Organisationsprinzipien der telomerischen und subtelomerischen Repeats, die vermutlich chromosomenspezifisch sind, wurden an Chromatinfasern aus *B. vulgaris* nachgewiesen. Desweiteren zeigt die Feinstrukturanalyse der centromernahen Region von *B. procumbens* eine hierarchische Organisation centromerischer Satellitenrepeats und Retrotransposons. Eine zentrale Region, in der pTS5-Satellitrepeats in hoher Kopienzahl vorliegen, wird von kleineren Domänen des nicht-homologen Satelliten pTS4.1 flankiert. Unterbrochen werden die Satellitenblöcke von Ty3-*gypsy*-Retrotransposons. Die vergleichenden FISH-Studien der Genomen der Elternarten und der nematodenresistenten Hybridlinien führten zu Hinweisen auf den Entstehungsprozess und die chromosomale Zusammensetzung der addierten Wildrüben-DNA in den Fragmentadditionslinien. Die im

Wildrüben genom pericentromerisch lokalisierten Satellitenrepeats wurden auf dem Fragment der Linie PRO1 terminal lokalisiert. Dies begründet die Vermutung, dass das Chromosomenfragment nach Bruch eines Wildrübenchromosoms in centromernaher Region entstanden ist. Der Aufbau und die Entstehung des Fragment in der Linie PAT2, deren integrierte DNA aus der Wildrübe *B. patellares* entstammt, ist zu dem Fragment in PRO1 divergent. Erste Untersuchungen des PAT2-Fragments lassen vermuten, dass ein Bruch im interkalaren Chromosomenbereich erfolgt ist.

Für die Untersuchung der züchterisch wertvollen Translokationslinie A906001 wurde die FISH zur chromosomalen Lokalisierung von unikalen Sequenzen erfolgreich erarbeitet. Zwei translokationsspezifischen YACs (künstliche Hefechromosomen = *Yeast Artificial Chromosomes*) sowie eine unikale Gensequenz wurden eindeutig detektiert. Durch *multi-colour* FISH mit YACs konnte die exakte Position und Orientierung der YAC-Sonden auf der Wildrüben translokation der Linie A906001 ermittelt werden. Die *in situ*-Hybridisierung eines translokationsspezifischen YACs an meiotischen Chromosomen bestätigten weiterhin die Annahme, dass Störungen im meiotischen Teilungsprozess zu einem Verlust des Resistenzgens führen und zur verminderten Transmission der Resistenz beitragen. In Teilungsstadien, die der meiotischen Prophase I nachfolgen, wurden Unregelmäßigkeiten in der Aufteilung der Chromosomen auf die Tochterkerne und das Auftreten von Minichromosomen beobachtet.

Die chromosomale Herkunft der integrierten DNA der Translokationslinie A906001 aus einer terminalen Chromosomenregion in der Wildrübe *B. procumbens* wurde durch FISH des Nematodenresistenzgens *HsI^{pro-1}* auf den Chromosomen der Translokationslinie, einer monosomen Additionslinie und der Wildrübe aufgezeigt. Die interne Sequenz des Nematodenresistenzgens *HsI^{pro-1}* von 684 bp, die als DNA-Sonde verwendet wurde, gehört zu den kürzesten bislang veröffentlichten unikalen Sequenzen, die im pflanzlichen Genom durch FISH detektiert wurde. Durch das hier etablierte Verfahren konnte die Nachweisgrenze der FISH unikalere Sequenzen in pflanzlichen Genomen erheblich gesenkt werden.

Die Einführung von hochauflösenden und hochempfindlichen FISH-Verfahren in der Genomanalyse der *Beta*-Arten sowie der Nachweis von unikalen Sequenzen ermöglicht erstmalig die physikalische Feinkartierung und Genlokalisierung im *Beta*-Genom durch Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung.

6. Summary

In the present study, fluorescent *in situ* hybridisation (FISH), the most important technique in molecular cytogenetics, has been used to investigate parental and hybrid genomes of the genus *Beta*. FISH techniques enabled the physical mapping of DNA sequences along chromosomes at mitosis and meiosis. Furthermore, with repeated DNA sequences as probes, FISH contributed to the understanding of chromosome architecture and sequence organisation.

Interspecific hybrids had been established by crosses of cultivated beet (*Beta vulgaris* L.) and wild beet, and resistance to beet cyst nematode *Heterodera schachtii* Schm. had been transferred to sugar beet (*B. vulgaris*) from the section *Procumbentes*. Progeny include nematode-resistant sugar beet lines containing an entire sugar beet genome ($2n=18$) and alien wild beet chromosomes, chromosome fragments or translocation carrying genes for resistance to the beet cyst nematode.

Understanding chromosome architecture in hybrid genomes requires comprehensive studies of the parental genome structure. The individual identification of six chromosome pairs of sugar beet was feasible by multi-colour FISH with telomeric, intercalary and pericentromeric repeats as DNA probes. The basis for karyotyping of sugar beet chromosomes are studies on decondensed meiotic chromosomes. Only the depiction of a complete atlas of meiosis in *B. vulgaris* led to the characterisation of all meiotic stages, making FISH studies of early meiotic sugar beet chromosomes possible, and hence improve the level of signal resolution.

Furthermore, the establishment of high-resolution FISH on extended DNA fibres (Fibre-FISH) allows precise positioning and orientation of DNA probes. Therefore, this FISH technique dramatically increases the resolution of visual mapping. Fibre-FISH has been used for physical mapping of repetitive sequences at chromosome ends and centromeric regions. Investigations of terminal chromosomal domains of sugar beet show variable organisation patterns of telomeric and subtelomeric repeats. Physical mapping of centromeric regions of wild beet chromosomes indicate that satellites and retrotransposons are organised hierarchically. Within a central chromosomal region, high copy numbers of pTS5 satellite repeats are flanked by smaller domains of non-homologous satellite pTS4.1. The satellite blocks are interspersed with small blocks of Ty3-gypsy-retrotransposons.

In interspecific hybrids discrimination of *B. vulgaris* and *B. procumbens* genomes and localisation of alien chromosomes, chromosome fragments or translocation has been performed by *in situ* hybridisation of genomic DNA (GISH) and FISH with genome-specific repetitive DNA probes.

The structure of chromosome fragments in monosomic addition lines were analysed by physical mapping of repetitive DNA sequences. Comparative studies of parental and hybrid genomes revealed possible mechanisms of the formation of minichromosomes in the fragment addition lines PRO1 and PAT2. Repeats with pericentromeric positions on the wild beet chromosomes were localised in terminal regions of the PRO1 fragment. Formation of the fragment after breakage within the centromeric region of a wild beet chromosome can be assumed. The composition and probably also the formation of the PAT2 fragment is different. First investigations indicated that breaking in intercalaric chromosome domains involved in formation of fragment.

For studying the translocation line A906001, the chromosomal localisation of single copy sequences has been established. The visual detection of YACs (yeast artificial chromosomes) and a single copy gene was possible with a high-sensitive FISH technique. Multi-colour FISH of two YACs carrying translocation-specific inserts enabled the determination of the exact position and orientation of YAC-contigs.

FISH with YAC128 confirmed the assumption, that disturbances in the meiotic division process result in damage of chromosomes and contribute to reduced transmission. The nematode resistant gene *HsI^{pro-1}* was localised by using an internal sequence of this gene as probe. The length of this single copy probe was only 684 bp. This is one of the shortest single copy probes in FISH on plant chromosomes published so far.

Visual detection of the single copy gene *HsI^{pro-1}* at chromosomes of wild beet, a monosomic addition line and the translocation line A906001 by FISH indicates the chromosomal origin of the resistance gene. The wild beet chromatin of the translocation line A906001 is derived from a terminal chromosomal region of *B. procumbens*.

High-sensitive and high-resolution techniques of FISH have been established in genome analysis of *Beta* species in the present studies.

7. Literaturverzeichnis

- ADAMS SP, HARTMAN TPV, LIM KY, CHASE MW, BENNETT MD, LEITCH IJ, LEICHT AR (2001). Loss and recovery of *Arabidopsis*-type telomere repeat sequence 5'-(TTTAGGG)_n-3' in the evolution of major radiation of flowering plants. *Proc R Soc Lond B*. 268: 1541-1546
- ALKHIMOVA AG, HESLOP-HARRISON JS, SHCHAPOVA AI, VERSHININ AV (1999). Rye chromosome variability in wheat-rye addition and substitution lines. *Chrom Res* 7(3): 205-212
- ALTSCHUL SF, GISH W, MILLER W, MYERS EW, LIPMAN DJ (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403-410
- AMBROS PF, MATZKE MA, MATZKE AJM (1986). Detection of a 17 Kb unique sequence (T-DNA) in plant chromosomes by *in situ* hybridization. *Chromosoma* 94: 11-18
- ANAMTHAWAT-JONSSON K (2001). Molecular cytogenetics of introgressive hybridization in plants. *Methods Cell Sci* 23(1-3): 139-148
- ANAMTHAWAT-JÓNSSON K, SCHWARZACHER T, LEITCH AR, BENNETT MD, HESLOP-HARRISON JS (1990). Discrimination between closely related *Triticeae* species using genomic DNA as a probe. *Theor Appl Genet* 79: 721-728
- ANANIEV EV, PHILLIPS RL, RINES HW (1998a) Chromosome specific molecular organisation of maize (*Zea mays* L.) centromeric regions. *PNAS USA* 95: 13073-13078
- ANANIEV EV, PHILLIPS RL, RINES HW (1998b). Complex structure of knob DNA on maize chromosome 9. Retrotransposon invasion into heterochromatin. *Genetics* 149: 2025-2037
- ARAGON-ALCAIDE L, MILLER T, SCHWARZACHER T, READER S, MOORE G (1996). A cereal centromeric sequence. *Chromosoma* 105: 261-268
- ARMSTRONG SJ, FRANKLIN CH, JONES GH (2001). Nucleolus-associated telomere clustering and pairing precede meiotic chromosome synapsis in *Arabidopsis thaliana*. *J Cell Sci* 114: 4207-4217
- ARUMUGANATHAN K, EARLE ED (1991). Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol Biol Rep* 9: 208-218
- BASS HW, RIERA-LIZARAZU O, ANANIEV EV, BORDOLI SJ, RINES HW, PHILLIPS RL, SEDAT JW, AGARD DA, CANDE WZ (2000). Evidence for the coincident initiation of homolog pairing and synapsis during the telomere-clustering (bouquet) stage of meiotic prophase. *J Cell Sci* 113: 1033-1042
- BASS HW, MARSHALL WF, SEDAT JW, AGARD DA, CANDE WZ (1997). Telomeres cluster de novo before initiation of synapsis: a three-dimensional spatial analysis of telomere positions before and during meiotic prophase. *J Cell Biol* 137:5-18
- BECKER H (1993). *Pflanzenzüchtung*. Stuttgart: Ulmer
- BENNETT MD, SMITH JB (1976). Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Philos Trans R Soc Lond (biol)* 274: 227-274
- BENNETZEN JL (1996). The contributions of retroelements to plant genome organisation, function and evolution. *Tr Microbiol*. 4: 347-53
- BENNETZEN JL (1998). The structure and evolution of angiosperm nuclear genomes. *Curr Opin Plant Biol* 1: 103-8

- BOSEMARK NO; BORMOTOV VE (1971). Chromosome morphology in a homozygous line of sugar beet. *Hereditas* 69: 205-212
- BRANDES A (1992). Erstellung und Charakterisierung von nematodenresistenten Additions- und Translokationslinien bei *B. vulgaris*. Dissertation, Universität Hannover
- BRANDES A, HESLOP-HARRISON JS, KAMM A, KUBIS S, DOUDRICK RL, SCHMIDT T (1997). Comparative analysis of the chromosomal and genomic organization of *Ty1-copia*-like retrotransposons in pteridophytes, gymnosperms and angiosperms. *Plant. Mol. Biol.* 33: 11-21
- BRANDES A, JUNG C, WRICKE G (1987). Nematode resistance derived from wild beet and its meiotic stability in sugar beet. *Plant Breeding* 99: 56-64
- BRANDES A, RODER MS, GANAL MW (1995). Barley telomeres are associated with two different types of satellite DNA sequences. *Chrom Res* 3: 315-320
- BRANDES A, THOMPSON H, DEAN C, HESLOP-HARRISON JS (1997). Multiple repetitive DNA sequences in the paracentromeric regions of *Arabidopsis thaliana* L. *Chrom Re.* 5(4): 238-246
- BROUN P, GANAL MW, TANKSLEY SD (1992). Telomeric arrays display high levels of heritable polymorphism among closely related plant varieties. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 1354-1357
- BROWN SE, STEOHENS JL, LAPITAN LV, KNUDSON DL (1999). FISH landmarks for barley chromosomes (*Hordeum vulgare* L.). *Genome* 42: 274-281
- BURKE DT, CARLE GF, OLSON MV (1987). Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. *Science* 236: 806-812
- CAI D, KLEINE M, KIFLE S, HARLOFF HJ, SANDAL NN, MARCKER KA, KLEIN-LANGHORST RM, SALENTIEN EMJ, LANGE W, STIEKEMA WJ, WYSS U, GRUNDLER FMW, JUNG C (1997). Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugar beet. *Science* 275: 832-834
- CAI D, KLEINE M, KLEIN-LANGHORST RM, SANDAL N, BOBKE T, HARLOFF H, JUNG C (1996). Vergleichende physikalische Kartierung von zwei nematodenresistenten Translokationslinien und Klonierung eines Nematodenresistenzgens aus der Zuckerrübe (*Beta vulgaris*). *Vort. Pflanzenzüchtung* 32: 133-135
- CAMILLERI C, LAFLEURIEL J, MACADRÉ C, VAROQUAUX F, PARMENTIER Y, PICARD G, CABOCHE M, BOUCHEZ D (1998). A YAC contig map of *Arabidopsis thaliana* chromosome 3. *Plant J* 14: 633-542
- CARLOS M, VICIENT I, RUSLAN KALENDAR I, SCHULMAN A H (2001). Envelope-Class retrovirus-Like Elements are widespread, transcribed and spiced, and insertionally polymorphic in plants. *Letter* 11(12): 2041-2049
- CARLTON PM, CANDE WZ (2002) Telomeres act autonomously in maize to organize the meiotic bouquet from a semipolarized chromosome orientation. *J Cell Biol* 15; 157(2): 231-242
- CHEN C, YAN H, ZHAI W, ZHU L, SUN J (2000) Identification and chromosomal location of a new tandemly repeated DNA in maize. *Genome* 43(1):181-184
- CHEN CC, CHEN CM, YANG JT, KAO YY (1998). Localization of a repetitive DNA sequence to the primary constriction of maize pachytene chromosomes. *Chrom Res* 6(3): 236-238

- CHEN CM, WANG CT, WANG CJ, HO CH, KAO YY, CHEN CC (1997). Two tandemly repeated telomere-associated sequences in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Chrom Res* 5(8): 561-668
- CHENG Z, PRESTING GG, ROBIN BUELL C, WING RA, JIANG J (2001a). High-resolution pachytene chromosomes mapping of bacterial artificial chromosomes anchored by genetic markers reveals the centromere location and the distribution of genetic recombination along chromosome 10 of rice. *Genetics* 157: 1749-1757
- CHENG Z, STUPAR RM, GU M, JIANG J (2001b). A tandemly repeated DNA sequence is associated with both knob-like heterochromatin and a highly decondensed structure in the meiotic pachytene chromosomes of rice. *Chromosoma* 110:24-31
- CHOO KHA (1994). In situ hybridization protocols. *Methods in Molecular Biology* 33. Human Press, Totowa, New Jersey
- CHOO KHA (1997). The centromere. Oxford University Press, New York
- CISTUE L, ROMAGOSA I, TSUCHIYA T, LASA M (1985). Karyotype analysis in haploid sugarbeet. *Bot Gaz* 146(2): 259-263
- CRASTA OR, FRANCKI MG, BUCHOLTZ DB, SHARMA HC, ZHANG J, WANG RC, OHM HW, ANDERSON JM (2000). Identification and characterization of wheat-wheatgrass translocation lines and localization of barley yellow dwarf virus resistance. *Genome* 43(4): 698-708
- CUADRADO A, SCHWARZACHER T (1998). The chromosomal organization of simple sequence repeats in wheat and rye genomes. *Chromosoma* 107: 587-594
- DECHYEVA D, GINDULLIS F, SCHMIDT T (2002). Divergence of satellite DNA und intersperion of dispersed repeats in the genome of the wild beet *Beta procumbens*. eingereicht
- DAUWERSE JG, WIEGANT J, RAAP AK, BREUNING MH, VAN OMMEN GJ (1992). Multiple colors by fluorescence in situ hybridization using ratio-labelled DNA probes create a molecular karyotype. *Hum Mol Genet* 1(8): 593-598
- DAVID A, WRIGHT I, YOYAS DF (2002). Athila4 of Arabidopsis and Calypso of Soybean define a lineage of endogenous plant retroviruses. *Letter* 12(1): 122-131
- DE JONG JH (1981) Investigation into chromosome morphology of sugar beet and related wild species. *Academisch Proefschrift*. *Genetica van de Universiteit van Amsterdam*
- DE JONG JH, FRANSZ P, ZABEL P (1999). High resolution FISH in plants-techniques and applications. *Trends Plant Sci.* 4 : 258-263
- DE JONG JH, OUD JL (1979). Location and behaviour of constitutive heterochromatin during meiotic prophase in *Beta vulgaris*. *Genetica* 51,2: 125-133
- DE JONG JH, SPECKMANN GJ, DE BOCK TH SM, VAN VOORST A (1986). Alien chromosome fragments conditioning resistance to beet cyst nematode in diploid descendants from monosomic additions of *Beta procumbens* to *B. vulgaris*. *Can J Genet Cytol* 28: 439-443
- DESEL C, JANSEN R, DEDONG G, SCHMIDT T (2002). Painting of parental chromatin in *Beta* hybrids by multi-colour fluorescent *in situ* hybridization. *Ann Bot* 89: 171-181
- DESEL C, JUNG C, CAI D, KLEINE M, SCHMIDT T. (2001) High-resolution mapping of YACs and the single-copy gene *HsI^{pro-1}* on *Beta vulgaris* chromosomes by multi-colour fluorescence in situ hybridization. *Plant Mol Biol* 45(1):113-22

- DONG F, JIANG J (1998a). Non-Rabl patterns of centromere and telomere distribution in the interphase nuclei of plant cells. *Chrom Res* 6(7):551-8
- DONG F, MILLER JT, JACKSON SA, WANG GL, RONALD PC, JIANG J (1998b) Rice (*Oryza sativa*) centromeric regions consist of complex DNA: *Proc Natl Acad Sci USA* 7;95(14):8135-8140
- DONG F, NOVY RG, HELGESON JP, JIANG J (1999). Cytological characterization of potato-*Solanum etuberosum* somatic hybrids and their backcross progenies by genomic in situ hybridization. *Genome* 42: 987-992
- DONG F, SONG J, NAESS SK, HELGESON JP, GEBHARDT C, JIANG J (2000). Development and applications of a set of chromosome-specific cytogenetic DNA markers in potato. *Theor Appl Genet* 101: 1001-1007
- EICKBUSH TH (1992). Transposing without ends: the non-LTR retrotransposable elements. *The new biologist* 4(5). 430-440
- ELLIS THN, LEED, THOMAS CM, SIMPSON PR, CLEARY WG, NEWMAN MA, BURCHAM KWG (1988). 5S rRNA genes in *Pisum*: Sequence, long range and chromosomal organization. *Mol Gen Genet* 214: 333-342
- FAJKUS J, KOVARIK A, KRAOVICS R, BEZDEK M (1995). Organization of telomeric and subtelomeric chromatin in the higher plant *Nicotiana tabacum*. *Mol Gen Genet* 247: 633-638
- FAN YS, DAVIS LM, SHOWS TB (1990). Mapping small DNA sequences by fluorescence in situ hybridization directly on banded metaphase chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 87(16): 6223-6227
- FEINBERG AP, VOGELSTEIN B (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Ann Biochem* 132: 6-13
- FESCHOTTE C, MOUCHES C (2000). Evidence that a family of miniature inverted-repeat transposable elements (MITEs) from *Arabidopsis thaliana* genome has arise from a pogo-like DNA transposon. *Mol Biol Evol* 17(5): 730-737
- FISCHER HE (1989). Origin of the 'Weisse Schlesische Rübe' (white Silesian beet) and resynthesis of sugar beet. *Euphytica* 41: 75-80
- FLAVELL AJ (1992). Ty1-*copia*-group retrotransposons and the evolution of retroelements in the eukaryotes. *Genetica* 86: 203-214
- FLAVELL RB, BENNETT MD, SMITH JB (1974). Genome size and the proportion of repeated DNA in plants. *Biochem Genet* 12: 257-269
- FALVELL RB, MOORE G (1996). Plant genome constituents and their organisation. In: *Plant Gene Isolation: Principles and Practice*. (Foster GD, Twell D eds). John Wiley & Sons Ltd.
- FLORIJN RJ, BONDEN LA, VROLIJK H, WIEGANT J, VAANDRAGER JW, BAAS F, DEN DUNNEN JT, TANKE HJ, VAN OMMEN GJ, RAAP AK (1995). High-resolution DNA fiber-FISH for genomic DNA mapping and colour bar-coding of large genes. *Hum Mol Genet* 4(5): 831-836
- FLORIJN RJ, VAN DE RIJKE FM, VROLIJK H, BLONDEN LA, HOFKER MH, DEN DUNNEN JT, TANKE HJ, VAN OMMEN GJ, RAAP AK (1996). Exon mapping by fiber-FISH or LR-PCR. *Genomics* 15; 38(3): 277-82

- FORSSTROM PO, MERKER A, SCHWARZACHER T (2002). Characterisation of mildew resistant wheat-rye substitution lines and identification of an inverted chromosome by fluorescent in situ hybridisation. *Heredity* 88(5): 349-355
- FRANSZ PF, ALONSO-BLANCO C, LIHARSKA T, PEETERS AJM, ZABEL P, DE JONG JH (1996). High resolution physical mapping in *Arabidopsis thaliana* and tomato by fluorescence in situ hybridisation to extended DNA fibres. *Plant J* 9: 421-430
- FRANSZ PF, ARMSTRONG S, DE JONG JH, PARNELL LD, VAN DRUNEN C, DEAN C, ZABEL P, BISSELING T, JONES GH (2000). Integrated cytogenetic map of chromosome arm 4S of *A. thaliana*: structural organization of heterochromatic knob and centromere region. *Cell* 100: 367-376
- FRANSZ PF, STAM S, MONTIJN B, TEN HOOPEN R., WIEGANT J, KOOTER JM, OUD O, NANNINGA N. (1996). Detection of single-copy genes and chromosome rearrangements in *Petunia* hybrids by fluorescence in situ hybridisation. *Plant J.* 9: 767-774
- FRITSCHKE K, METZLAFF M, MELZER R, HAGEMANN R (1987). Comparative restriction endonuclease analysis and molecular cloning of plastid DNAs from wild species and cultivated varieties of the genus *Beta* (L.). *Theor Appl Genet* 74: 589-594
- FUCHS J, BRANDES A, SCHUBERT I (1995). Telomere sequence localization and karyotype evolution in higher plants. *Plant Syst Evol* 196: 227-241
- FUCHS J, HOUBEN A, BRANDES A, SCHUBERT I (1996a). Chromosome „painting“ in plants- a feasible technique? *Chromosoma* 104(5): 315-320
- FUCHS J, KLOOS DU, GANAL MW, SCHUBERT I (1996b). In situ localization of yeast artificial chromosome sequences on tomato and potato metaphase chromosomes. *Chrom. Res.* 4(7): 277-281
- FUCHS J, PICH U, MEISTER A, SCHUBERT I (1994). Differentiation of field bean heterochromatin by in situ hybridization with a repeated FokI sequence. *Chrom. Res.* 2(1): 25-28
- FUKUI K, NAKAYAMA I (1996). *Plant chromosomes. Laboratory methods.* CRC Press, Inc.
- FUKUI K, SHISHIDO R, KINOSHITA T (1997). Identification of the rice D-genome chromosomes by genomic *in situ* hybridisation. *Theor Appl Genet* 95: 1239-1245
- FUKUI KN, SUZUKI G, LAGUDAH ES, RAHMAN S, APPELS R, YAMAMOTO M, MUKAI Y (2001). Physical arrangement of retrotransposon-related repeats in centromeric regions of wheat. *Plant Cell Physiol* 42(2): 189-96
- GALASSO I, SCHMIDT T, PIGNONE D (2001). Identification of *Lens culinaris* ssp. *culinaris* chromosomes by physical mapping of repetitive DNA sequences. *Chrom Res* 9: 199-209
- GALASSO I., HARRISON GE, SCHMIDT T, PRIGNONE D, HESLOP-HARRISON JS (1995). Location of two repeated DNA sequences of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. on chromosomes and extended DNA fibres by FISH. *Theor. Appl Genet* 91: 928-935
- GALL JG, PARDUE ML (1969). Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci USA Jun*;63(2): 378-383
- GANAL MW, BROUN P, TANKSLEY SD (1992). Genetic mapping of tandemly repeated telomeric DNA sequences in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Genomics* 14(2): 444-448

- GAO D, SCHMIDT T, JUNG C (2000). Molecular characterization and chromosomal distribution of species-specific repetitive DNA sequences from *Beta corolliflora*, a wild relative of sugar beet. *Genome* 43(6):1073-80
- GARRIDO-RAMOS MA, DE LA HERRAN R, RUIZ REJON M, RUIZ REJON C (1999). A genome subtelomeric satellite DNA family isolated from the genome of the dioecious plant *Silene latifolia*. *Genome* 42(3): 442-446
- GERLACH WL, BEDBROOK JR (1979). Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. *Nuc Acids Res* 7: 1869-1885
- GINDULLIS F, DECHYEVA D, SCHMIDT T (2001A). Constuction and characterization of BAC library for the molecular dissection of a single wild beet centromere and sugar beet (*Beta vulgaris*) genome analysis. *Genome* 44: 846-855
- GINDULLIS F, DESEL C, GALASSO I, SCHMIDT T (2001b). The large-scale organization of the centromeric region in Beta species. *Genome Res* 11(2): 253-265
- GOLDEN AM (1959) Susceptibility of several *beta* species to the sugar beet nematode (*Heterodera schachtii*) and rootknot nematodes (*Meloidogyne* ssp.) *J Am Soc Sugar Beet Technol.* 10: 444-447
- GOMEZ MI, ISLAM-FARIDI MN, WOO SS, SCHERTZ KF, CZESCHIN D, ZWICK MS, WING RA, STELLY DM, PRICE HJ (1997). FISH of meize *sh2*-selected sorghum BAC to chromosomes of *Sorghum bicolor*. *Genome* 40: 475-478
- GRADY DL, RATLIFF RL, ROBINSON DL, MCCANLIES EC, MEYNE J, MOYZIS RK (1992). Highly conserved repetitive DNA sequences are present at human centromeres. *Proc Natl Acad Sci USA* 89(5): 1695-1699
- GRANDBASTIEN MA, SPIELMANN A, CABOCHE M (1989). Tnt1, a mobile retroviral-like transposable element of tobacco isolated by plant cell genetics. *Nature* 337: 376-380
- GRUNDLACH H (2001). Digital microscopy for multiparameter FISH imaging. *Anal Quant Cytol Histol* 23: 268-272
- HAGEMANN R (1999) *Allgemeine Genetik*. Spektrum Gustav Fischer Verlag
- HALLDEN C, NILSSON NO, HJERDIN A, RADING IM (1996). A gel electrophoresis system adapted for large-scale molecular marker analysis. *Anal Biochem* 242(1): 145-7
- HANSON H, MATHEW CG, DOCHERTY Z, MACKIE OGILVIE C (2001). Telomere shortening in Fanconi anaemia demonstrated by a direct FISH approach. *Cytogenet Cell Genet* 93(3-4): 203-206
- HANSON RE, ZWICK MS, CHOI S, ISLAM-FARIDI MN, MCKNIGHT TD, WING RA, PRICE HJ, STELLY DM (1995). Fluorescent in situ hybridization of a bacterial artificial chromosome. *Genome* 38(4): 646-651
- HARRISON GE, HESLOP-HARRISON JS (1995). Centromeric repetitive DNA sequences in the genus *Brassica*. *Theor Appl Genet* 90: 157-165
- HEIJBROEK W, ROELANDS AJ, DE JONG JH, VAN HULST CG, SHCOONE AHL, MUNNING RG (1988). Sugar beets homozygous for resistance to beet cyst nematode (*Heterodera schachtii* Schm.) developed from monosomic additions of *B. procumbens* to *B. vulgaris*. *Euphytica* 38: 121-131
- HEISKANEN M, HELLSTEN E, KALLIONIEMI OP, MÄKEÖÄ TP, ALITALO K, PELTONEN L, PALOTIE A (1995). Visual mapping by Fiber-FISH. *Genomics* 30: 31-36

- HEISKANEN, M.; PELTONEN, L. & PALOTIE, A. (1996). Visual mapping by high resolution FISH. *Trends in Genetics* 12 (10): 379-382
- HELLER R, SCHONDELMAIER J, STEINRÜCKEN G, JUNG C (1996). Genetic localisation of four genes for nematode (*Heterodera schachtii* Schm.) resistance in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Theor Appl Genet* 92: 991-997
- HEMLEBEN, V. (1990). *Molekularbiologie der Pflanzen*. Gustav Fischer Verlag-Stuttgart (ISBN 3-437-204441-6)
- HENG, H.H.Q.; SQUIRE, J. & TSUI, L.-C. (1992). High resolution mapping of mammalian genes by in situ hybridisation to free chromatin. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 9509-9513
- HENIKOFF S (2002). Near the edge of a chromosome's black hole. *Trends Genet* 18(4): 165-167
- HESLOP-HARRISON JS (1996). Comparative analysis of plant genome architecture. In: *Unifying Plant Genomes*. 50th SEB Symposium (Heslop-Harrison JS ed), 17-23, Company of Biologists, Cambridge
- HESLOP-HARRISON JS (2000). Comparative genome organisation in plants: From Sequence and Markers to Chromatin and Chromosomes. *Plant Cell* 12, 617-635
- HESLOP-HARRISON JS, BRANDES A, TAKETA S, SCHMIDT T, VERSHININ AV (1997). The chromosomal distribution of Ty1-*copia* group retrotransposable elements in higher plants and their implication for genome evolution. *Genetica* 100: 197-204
- HESLOP-HARRISON JS, HARRISON GE, LEITCH IJ (1992). Reprobing of DNA:DNA *in situ* hybridization preparations. *Trends Genet* 8: 372-373
- HESLOP-HARRISON JS, MURATA M, OGURA Y, SCHWARZACHER T, MOTOYOSHI F (1999). Polymorphisms and genomic organization of repetitive DNA from centromeric regions of *Arabidopsis* chromosomes. *Plant Cell* 11(1): 31-42
- HESLOP-HARRISON JS, SCHWARZACHER T (1996). Genomic Southern and *in situ* hybridization for plant genome analysis. In: Jauhar PP, ed. *Methods of genome analysis in plants*. Boca Raton: CRC: 163-179
- HIATT EM, KENTNER EK, DAWE RK (2002). Independently regulated neocentromere activity of two classes of tandem repeat array. *Plant Cell* 14(2): 407-420
- HIGASHIYAMA T, NOUTOSHI Y, FUJIE M, YAMADA T (1997). Zepp, a LINE-like retrotransposon accumulated in the *Chlorella* telomeric region. *Embo J* 16(12): 3715-3723
- HIROCHIKA H & HIROCHIKA R (1993). Ty1-*copia*- group retrotransposons are ubiquitous components of plant genomes. *Japan J. Genet* 68: 35-46
- HOFFMANN W, MUDRA A, PLARRE W (1971). *Lehrbuch der Züchtung landwirtschaftlicher Kulturpflanzen*. Parrey Berlin
- HOLMES DS, QUIGLEY M (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Ann Biochem* 114: 193-197
- HUDAKOVA S, MICHALEK W, PRESTING GG, TEN HOOPEN R, DOS SANTOS K, JASENCAKOVA Z, SCHUBERT I (2001). Sequence organization of barley centromeres. *Nucleic Acids Research* 29 (24): 5029-5035
- IISSER T, TUTOIS S, TOURMENTE S, DERAGON JM, PICARD G (1996). DNA regions flanking the major *Arabidopsis thaliana* satellite are principally enriched in *Athila* retroelement sequences. *Genetica* 97: 141-151

- JACKSON S, FENGGAO D, JIANG J (1999). Digital mapping of bacterial artificial chromosomes by fluorescence in situ hybridization; *Plant J.* 17 (5), 581-587
- JACKSON S; WANG SM; GOODMAN HM; JIANG J (1998). Application of fiber-FISH in physical mapping of *Arabidopsis thaliana*. *Genome* 41: 566-572
- JACKSON SA, CHENG Z, WANG ML, GOODMAN HM, JIANG J (2000). Comparative fluorescence in situ hybridization mapping of a 431-kb *Arabidopsis thaliana* bacterial artificial chromosome contig reveals the role of chromosomal duplications in the expansion of the *Brassica rapa* genome. *Genetics* 156(2): 833-838
- JANSEN R (1999). Molekulare und zytologische Analyse von repetitiven DNA-Sequenzen der Sektion *Corollinae* der Gattung *Beta*. Diplomarbeit. Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, CAU Kiel.
- JIANG J, GILL BS (1994). Nonsiotopic in situ hybridization and plant genome mapping: the first 10 years. *Genome* 37: 717-725
- JIANG J, GILL BS, WANG GL, RONALD PC, WARD DC (1995). Metaphase and interphase fluorescence in situ hybridization mapping of the rice genome with bacterial artificial chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* May 9;92(10): 4487-4491
- JIANG J, NASUDA S, DONG F, SCHERRER CW, WOO SS, WING RA, GILL BS, WARD DC (1996). A conserved repetitive DNA element located in the centromeres of cereal chromosomes. *PNAS USA* 93: 14210-14213
- JUNG C, CAI D, KLEINE M (1998). Engineering nematode resistance in crop species. *Trends Plant Sci* 3 (7): 266-271
- JUNG C, KLEINE M, FISCHER F, HERMANN RG (1990). Analysis of DNA from a *Beta procumbens* chromosome fragment in sugar beet carrying a gene for nematode resistance. *Theor Appl Genet* 79: 663-672
- JUNG C, KOCH R, FISCHER F, BRANDES A, WRICKE G, HERRMANN RG (1992). DNA markers closely linked to nematode resistance genes in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). using chromosome additions and translocations originating from wild beets of the *Procumbentes* species. *Mol Gen Genet* 232: 271-278
- JUNG C; SPECKMANN GJ; DE BROCK TSM; LANGE W; VAN VOORST A (1986). Alien chromosome fragments conditioning resistance to beet cyst nematode in diploid descendants from monosomic additions of *Beta procumbens* to *B. vulgaris*. *Can J Genet Cytol* 28: 439-443
- JUNG C, WRICKE G (1987). Selection of diploid nematode resistant sugar beet from monosomic addition lines. *Plant Breeding* 98: 205-214
- JUNG, C. (1987). Breeding for nematode resistance in sugar beet. *Annals of Biology* 3: 15-25
- JUNGHANS H, METZLAFF M (1988). Genome specific, highly repeated sequences of *Hordeum vulgare*: cloning, sequencing and squash dot test. *Theor Appl Genet* 76: 728-732
- KAMM A, GALASSO I, SCHMIDT T, HESLOP-HARRISON JS (1995). Analysis of a repetitive DNA family from *Arabidopsis arenosa* and relationships between *Arabidopsis* species. *Plant Mol Biol* 27(5): 853-862
- KARPEN GH & ALLSHIRE RC (1997). The case for epigenetic effects on centromere identity and function. *TIG* 13(12): 489-496

- KASAHARA K, TAGUCHI T, YAMASAKI I, KARASHIMA T, KAMADA M, YURI K, SHUIN T (2001). Fluorescence in situ hybridization to assess transitional changes of aneuploidy for chromosomes 7, 8, 10, 12, 16, X and Y in metastatic prostate cancer following anti-androgen therapy. *Int J Oncol* 19(3): 543-549
- KATSIOTIS A, SCHMIDT T, HESLOP-HARRISON JS (1996): Chromosomal and genomic organization of *Ty1-copia*-like retrotransposons sequences in the genus *Avena*. *Genome* 39: 410-417
- KHRUSTALEVA LI, KIK C (2001). Localization of single-copy T-DNA insertion in transgenic shallots (*Allium cepa*) by ultra-sensitive FISH with tyramide signal amplification. *Plant J* 25 (6): 699-707
- KIDWELL MG, LISCH D (1997). Transposable elements as sources of variation in animals and plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 7704-7711
- KISHIMA Y, YAMASHITA S, MARTIN C, MIKAMI T (1999). Structural conservation of the transposon Tam3 family in *Antirrhinum majus* and estimation of the number of copies able to transpose. *Plant Mol. Biol.*39(2): 299-308
- KLEINE M (1993). Die Klonierung von DNA aus Zuckerrüben (*Beta vulgaris*) und Gerste (*Hordeum vulgare* L.) in künstlichen Hefechromosomen (YACs) und die Isolation und Charakterisierung von definierten Klonen. Dissertation, Universität München.
- KLEINE M, CAI D, EIBL D, HERRMANN RG, JUNG C (1995). Physical mapping and cloning of a translocation in sugar beet (*Beta vulgaris*L.) carrying a gene for nematode (*Heterodera schachtii* Schm.) resistance from *B. procumbens*. *Theor. Appl. Genet.* 90: 399-409
- KLEINE M, CAI D, KLEIN-LANGHORST RM, SANDAL NN, SALENTIJN EMJ, HARLOFF H., KIFLE S, MARCKER KA, STIEKEMA WJ, JUNG C (1997). Breeding for nematode resistance in sugar beet: a molecular approach. Fenoll, C., Grundler, F.M.W.; Ohl, S.A. (Hrsg), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht: 176-190
- KLINKE A, MÜLLER J, WRICKE G (1996). Characterization of nematode resistance genes in the section Procumbentes genus *Beta*: response to two populations of *Heterodera schachtii*. *Theor Appl Genet* 1996: 773-779
- KOSINA R, HESLOP-HARRISON JS (1996). Molecular cytogenetic of an amphiploid trigeneric hybrid between *Triticum durum*, *Thinopyrum distichum* and *Lophopyrum elongatum*. *Ann Bot* 78: 583-589
- KOUKALOVA B, REICH J, MATYASEK R, KUHOVA V, BEZDEK M (1989). A *Bam*HI family of highly repeated DNA sequences of *Nicotiana tabacum*. *Theor Appl Genet* 78: 77-80
- KUBIS S, HESLOP-HARRISON JS, DESEL C, SCHMIDT T (1998). The genomic organization of non-LTR retrotransposons (LINEs) from three *Beta* species and five other angiosperms. *Plant Mol Biol* 36: 821-831
- KUBIS S, HESLOP-HARRISON JS, SCHMIDT T (1997). A family of differentially amplified repetitive DNA sequences in the genus *Beta* reveals genetic variation in *Beta vulgaris* subspecies and cultivars. *J Mol Evol* 44: 310-320
- KUMAR A, BENNETZEN JL (1999). Plant Retrotransposons. *Annu Rev Genet* 33: 479-532
- KUMAR A, PEARCE SR, MCLEAN K, HARRISON G, HESLOP-HARRISON JS, WAUGH R, FLAVELL AJ (1997). The *Ty1-copia* group of retrotransposons in plants: genomic

- organisation evolution , and use as molecular markers. *Genetica* 100(1-3): 205-217
- KUNZE R, SAEDLER H, LÖNNING W (1997) Plant transposable elements. *Adv Bot Res* 27: 332-470
- LANGE W, BRANDENBURG WA, DE BROCK TSM (1999). Taxonomy and cultonomy of beet (*Beta vulgaris* L.). *Botanical J Linnean Soc* 130: 81-96
- LANGE W, MÜLLER J., DE BROCK TSM (1993). Virulence in the beet cyst nematode (*Heterodera schachtii*) versus some alien genes for resistance in beet. *Fundam. Appl Nematol* 16: 447-454
- LANGER-SAFER PR, LEVINE M, WARD DC. (1982). Immunological method for mapping genes on *Drosophila* polytene chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* Jul;79(14): 4381-4385
- LAPITAN NLV (1992). Organization and evolution of higher plant nuclear genomes. *Genome* 35, 171-181
- LATEN HM (1999). Phylogenetic evidence for Ty1-copia-like endogenous retroviruses in plant genomes *Genetica*;107(1-3): 87-93
- LE MH, DURICKA D, KARPEN GH (1995). Islands of complex DNA are widespread in *Drosophila* centric heterochromatin. *Genetics* 141(1): 283-303
- LEITCH AR, SCHWARZACHER T, JACKSON D, LEITCH IJ (1994). *In situ*-Hybridisierung. Spektrum, Heidelberg
- LEITCH IJ, BENNETT MD (1997). Polyploidy in angiosperms. *Trends Plant Sci* 2(12): 470-476
- LEITCH IJ, HESLOP-HARRISON JS (1993). Physical mapping of the 18S-5.8S-26S rRNA genes in barley by *in situ* hybridization. *Genome* 35: 1013-1018.
- LEITCH IJ, HESLOP-HARRISON JS (1994). Detection of digoxigenin-labeled DNA probes hybridized to plant chromosomes *in situ* *Methods. Mol Biol* 28: 177-185
- LEITCH IJ, LEITCH AR, HESLOP-HARRISON JS (1991). Physical mapping of plant DNA sequences by simultaneous *in situ* hybridization of two differently labelled fluorescent probes. *Genome* 34: 329-333
- LENOIR A, COURNOYER B, WARNICK S, PICARD G, DERAGON JM (1997). Evolution of SINE S1 Retroposons in *Cruciferae* Plant Species. *Mol Biol Evol* 14(9): 934-941
- LICHTER JB, DIFILIPPANTONIO MJ, PAKSTIS AJ, GOODFELLOW PJ, WARD DC, KIDD KK (1993). Physical and genetic maps for chromosome 10. *Genomics* 16(2): 320-324
- LICHTER P (1997). Multicolor FISHing: what's the catch. *Trends Genet* 13(12): 475-479
- LICHTER P, CREMER T, BORDEN J, MANUELIDIS L, WARD DC (1988). Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by *in situ* suppression hybridization using recombinant DNA libraries. *Hum. Genet.* 80: 224-234
- LILLY JW, HAVEY MJ, JACKSON SA, JIANG J.P (2001). Cytogenomic analyses reveal the structural plasticity of the chloroplast genome in higher plants. *Plant Cell* 13(2): 245-254
- LIM KB, WENNEKES J, DE JONG HJ, JACOBSEN E, VAN TUYL JM (2001) Karyotype analysis of *Lilium longiflorum* and *Lilium rubellum* by chromosome banding and fluorescence *in situ* hybridisation. *Genome* 44: 911-918

- LÖPTIEN H (1984a). Breeding nematode-resistant beets. I. Development of resistant alien additions by crosses between *Beta vulgaris* and wild species of the section *Patellares*. Z. Pflanzenzücht. 92: 208-220
- LÖPTIEN H (1984b). Breeding nematode-resistant beets. II. Investigations into the inheritance of resistance to *Heterodera schachtii* Schm. in wild species of the section *Patellares*. Z. Pflanzenzücht. 93: 237-245
- LOTTSPREICH F, ZORBAS H (1998). Bioanalytik. Heidelberg: Berlin: Spektrum. Akd. Verl.
- LYSAK MA, FRANSZ PF, HODA BMA, SCHUBERT I (2001). Chromosome painting in *Arabidopsis thaliana*. Plant J 28(6): 689-697
- MANUELIDIS L, LANGER-SAFER PR, WARD DC (1982). High-resolution mapping of satellite DNA using biotin-labeled DNA probes. J. Cell Biol. 95(2Pt 1): 619-625
- MARTIN C, CARPENTER R, SOMMER H, SAEDLER H, COEN ES (1985). Molecular analysis of instability of flower pigmentation in *Antirrhinum majus* following isolation of the *pallida* locus by transposon tagging. EMBO J 4: 1625-1630
- MARTINEZ-PEREZ E, SHAW P, READER S, ARAGON-ALCAIDE L, MILLER T, MOORE G (1999). Homologous chromosome pairing in wheat. J Cell Sci 112 (Pt 11): 1761-1769
- MARTINEZ-ZAPATER JM, ESTELLE MA, SOMERVILLE CR (1986). A highly repeated DNA sequences in *Arabidopsis thaliana*. Plant J. 1: 159-156
- MCALLISTER BF, WERREN JH (1999). Evolution of tandemly repeated sequences: What happens at the end of an array. J Mol Evol 48(4): 469-481
- MCCLINTOCK B (1954). Mutations in maize and chromosomal aberration in *Neurospora*. Carnegie Inst. Wash. Yearbook 53: 254-260
- MCKNIGHT TD, RIHA K, SHIPPEN DE (2002) Telomeres, telomerase, and stability of the plant genome. Plant Mol Biol 48(4): 331-337
- MESBAH M, WENNEKES-VAN EDEN J, DE JONG HJ, DE BOCK TSM, LANGE W (2000). FISH to mitotic chromosomes and extended DNA fibres of *Beta procumbens* in a series of monosomic additions to beet (*B. vulgaris*). Chrom Res 8: 285-293
- MEYERWITZ EN, PRUITT RE (1985). *Arabidopsis thaliana* and plant molecular genetics. Science 229, 1214-1218
- MIKHAILOVA EI, NARANJO T, SHEPHERD K, WENNEKES-VAN EDEN J, HEYTING C, DE JONG HJ (1998). The effect of the wheat Ph1 locus on chromatin organisation and meiotic chromosome pairing analysed by genome painting. Chromosoma 107(5): 339-350
- MIKHAILOVA EI, SOSNIKHINA SP, KIRILLOVA GA, TIKHOLIZ OA, SMIRNOV VG, JONES RN, JENKINS G.J (2001). Nuclear dispositions of subtelomeric and pericentromeric chromosomal domains during meiosis in asynaptic mutants of rye (*Secale cereale* L.). Cell Sci 114(Pt 10): 1875-1882
- MILLER J, DONG F, JACKSON S (1998). Retrotransposons-related DNA-sequence in the centromer of grass chromosomes. Genetics 150
- MOLNAR-LANG M, LINC G, LOGOJAN A, SUTKA J (2000). Production and meiotic pairing behaviour of new hybrids of winter wheat (*Triticum aestivum*) x winter barley (*Hordeum vulgare*). Genome 43(6): 1045-1054
- MONTIJN MB, HOUTSMULLER AB, OUD JL, NANNINGA N. (1994). The spatial localization of 18 S rRNA genes, in relation to the descent of the cells, in the root cortex of *Petunia hybrida*. J Cell Sci 107 (Pt 3): 457-467

- MOORE G (1998). To pair or not to pair: chromosome pairing and evolution. *Curr Opin Plant Biol* 1(2): 116-122
- MOORE G, ROBERTS M, ARAGON-ALCAIDE L, FOOTE T (1997). Centromeric sites and cereal chromosome evolution. *Chromosoma* 105(6): 321-323
- MOSCONE, E.A.; MATZE, M.A. & A.J.M. MATZE (1996). The use of combined FISH/GISH in conjunction with DAPI counterstaining to identify chromosomes containing transgen inserts in amphidiploid tobacco. *Chromosoma* 105: 231-236
- MUKAI Y, FRIEBE B, HATCHATT JH, YAMAMOTO M, GILL BS (1993). Molecular cytogenetic analysis of radiation-induced wheat-rye terminal and intercalary chromosomal translocations and the detection of rye chromatin specifying resistance to Hessian fly. *Chromosoma* 102: 88-95
- MÜLLER J (1999). Jahresbericht 1999. Insitut für Nematologie und Wirbeltierkunde in Münster mit Außenstelle in Eldorf und Kleinmachnow.
- MURO Y, MASUMOTO H, YODA K, NOZAKI N, OHASHI M, OKAZAKI T (1992). Centromer protein B assembles human centromeric α -satellite at the 17-bp sequence, CENP-B box. *J Cell Biol* 166: 585-596
- NAKAMURA C, TSUCHIY T (1988). Nematode resistance and meiotic abnormality in diploid sugar beet selected from interspecific *Beta vulgaris* X *Beta procumbens* hybrids. *Plant Breeding* 100, 41-53
- NAKAMURA C, TSUCHIYA T (1982). Pachytene chromosome morphology in diploid sugar beet, *Beta vulgaris*. *Z. Pflanzenzüchtung* 89: 229-244
- OHMIDO N, AKIYAMA Y, FUKUI K (1998). Physikal mapping of unique nucleotide sequences on identified rice chromosomes. *Plant Mol Biol* 38: 1043-1052
- OHMIDO N, KIJIMA K, AKIYAMA Y, DE JONG JH, FUKUI K (2000). Quantification of total genomic DNA and selected repetitive sequences reveals concurrent changes in different DNA families in indica and japonica rice. *Mol Gen Genet* 263(3): 388-394
- OHMIDO N, KIJIMA K, ASHIKAWA I, DE JONG JH, FUKUI K (2001). Visualization of the terminal structure of rice chromosomes 6 and 12 by multi color FISH to chromosomes and extended DNA fibers. *Plant Mol Biol.* 47(3): 413-21
- OOSUMI T, BELKNAP WR (1997). Characterization of the Sol3 family of nonautonomous transposable elements in tomato and potato. *J. Mol. Evol.* 45(2):137-44
- ØRGAARD M, JACOBSEN N, HESLOP-HARRISON JS (1995). The hybrid origin of two cultivars of *Crocus* (Iridaceae). analysed by molecular cytogenetics including genomic southern and *in situ* hybridization. *Ann Bot* 76: 252-262.
- PARDUE ML, DEBARYSHE PG (1999). Telomeres and telomerase: more than the end of the line. *Chromosoma* 108: 73-82
- PARDUE ML, GALL JG (1969). Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 64(2): 600-604
- PAROKONNY AS, KENTON AY, GLEBA YY, BENNETT MD (1993). Genome reorganization in *Nicotiana* asymmetric somatic hybrids analysed by *in situ* hybridization. *Plant J* 3(2): 359
- PARRA I, WINDLE B (1993). High resolution visual mapping of stretched DNA by fluorescent hybridization. *Nat Genet* 5: 17-22

- PEACOCK WJ, RHODES MM, PRYOR AJ (1981). Highly repeated DNA sequence limited to knob heterochromatin in maize. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 4490-4494
- PEARCE SR, HARRISON G, LI D, HESLOP-HARRISON JS, KUMAR A, FLAVELL AJ (1996). The Ty1- *copia* group retrotransposons in *Vicia* species: copy number, sequence heterogeneity and chromosomal localisation. *Mol Gen Genet* 250: 305-315
- PEDERSEN C, RASMUSSEN SK, LINDE-LAURSEN I (1996). Genome and chromosome identification in cultivated barley and related species of the Triticeae (*Poaceae*) by in situ hybridization with the GAA-satellite sequence. *Genome* 39(1): 93-104
- PETERSON DG, LAPITAN NLV, STACK SM (1999). Localization of single- and low-copy Sequences on tomato synaptonemal complex spreads using fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Genetics* 152: 427-439
- PICH U, FUCHS J, SCHUBERT I (1996). How do Alliaceae stabilize their chromosome ends in the absence of TTTAGGG sequences? *Chrom Res* 4: 207-213
- PICKERING RA, MALYSHEV S, KÜNZEL G, JOHNSTON PA, KORZUM V, MENKE M, SCHUBERT I (2000). Locating introgressions of *Hordeum bulbosum* chromatin within the *H. vulgare* genome. *Theor Appl Genet* 243: 173-177
- PILLEN K, STEINRÜCKEN G, WRICKE G, HERRMANN RG, JUNG C (1993). An extended linkage map of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) including nine putative lethal genes and the restorer gene X. *Plant Breed* 111: 265-272
- PINKEL D, LANDEGENT J, COLLINS C, FUSCOE J, SEGRAVES R, LUCAS J, GRAY JW (1988). Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocation of chromosome 4. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 9138-9142.
- POGGIO L, CONFALONIERI V, COMAS C, GONZALEZ G, NARANJO CA (1999). Genomic affinities of *Zea luxurians*, *Z. diploperennis*, and *Z. perennis*: Meiotic behaviour of their F₁ hybrids and genomic in situ hybridization (GISH). *Genome* 42: 993-1000
- PREIZNER J, TAKACS I, BILGIN M, GYÖRGYÉY J, DUDITS D, FEHER A (1994). Organization of a *Solanum brevidens* repetitive sequence related to the TGRI subtelomeric repeats of *Lycopersicon esculentum*. *Theor Appl Genet* 89: 1-8
- PRESTING GG, MALYSHEVA L, FUCHS J, SCHUBERT I (1998). A Ty3/*GYP*SY retrotransposon-like sequence localizes to the centromeric regions of cereal chromosomes. *Plant J* 16: 721-728
- PRIUTT RE, MEYEROWITZ EM (1986). Characterization of the genome of *Arabidopsis thaliana*. *J Mol Biol* 187: 169-183
- RAAP AK (1998) Advances in fluorescence in situ hybridization. *Mutation Res* 400: 287-298
- RAAP AK, FLORIJN RJ, BLONDEN LAJ, WIEGANT J, VAANDRAGER JW, VROLIJK H, DEN DUNNEN J, TANKE HJ, VAN OMMEN GJ (1996). Fiber FISH as a DNA Mapping Tool. *Meth* 9(1): 67-73
- RAAP AK, VAN DE CORPUT MP, VERVENNE RA, VAN GIJLSWIJK RP, TANKE HJ, WIEGANT J (1995). Ultra-sensitive FISH using peroxidase-mediated deposition of biotin- or fluorochrome tyramides. *Human Mol Genet* 4: 529-534
- RABL (1985). Zellteilung. *Morphol. Jahrb.* 10: 214-330

- RAINA S, MAHALINGAM R, CHEN F, FEDOROFF N (2002). A collection of sequences and mapped Ds transposon insertion sites in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 50(1): 93-110
- RANJEKAR PK, PALLOTTA D, LAFONTAINE JG (1976). Analysis of the genome of plants. II. Characterization of repetitive DNA in barley (*Hordeum vulgare*) and wheat (*Triticum aestivum*). *Biochim Biophys Acta* 425(1): 30-40
- RANJEKAR PK, PALLOTTA D, LAFONTAINE JG (1978). Analysis of plant genomes. V. Comparative study of molecular properties of DNAs of seven *Allium* species. *Biochem Genet* 16(9-10): 957-970
- RAYBURN AL, GILL BS (1985). Use of biotin-labeled probes to map specific DNA sequences on wheat chromosomes. *J Hered* 76: 78-81
- REAMON-RAMOS SM, WRICKE G (1992). A full set of monosomic addition lines in *Beta vulgaris* from *Beta webbiana*: morphology and isozyme markers. *Theor Appl Genet* 84: 411-418
- REEVES A (2001). Micromeasure: A new computer program for the collection and analysis of cytogenetic data. *Genome* 44 (3): 439-443
- RICHARDS EJ, AUSUBEL FM (1988). Isolation of a higher eukaryotic telomere from *Arabidopsis thaliana*. *Cell* 53: 127-136
- RICHARDS EJ, CHAO S, VONGS A, YANG J (1992). Characterization of *Arabidopsis thaliana* telomeres isolated in yeast. *Nuc Acids Res* 20(15): 4039-46
- RICHARDS EJ, GOODMAN HM, AUSUBEL FM (1991). The centromere region of *Arabidopsis thaliana* chromosome 1 contains telomere-similar sequences. *Nuc Acids Res* 19(12): 3351-3357
- RODER SM, LAPITAN NLV, SORRELLS ME, TANKSLEY SD (1993). Genetic and physical mapping of barley telomeres. *Mol Gen Genet* 238: 294-303
- RÖDER SM, SORRELLS ME, TANKSLEY SD (1992). 5S ribosomal gene clusters in wheat: pulse field gel electrophoresis reveal a high degree of polymorphism. *Jour Gen Genet* 232: 215-220
- RODRIGUEZ S, PERERA E, MAESTRA B, DIEZ M, NARANJO T (2000). Chromosome structure of *Triticum timopheevii* relative to *T. turgidum*. *Genome* 43(6): 923-930
- ROSENBERG C, FLORIJN RJ, VAN DE RIJKE FM, BLONDEN LA, RAAP TK, VAN OMMEN GJ, DEN DUNNEN JT (1995). High resolution DNA fiber FISH on yeast artificial chromosomes: direct visualization of DNA replication. Erratum in: *Nat Genet* Sep;11(1):104
- ROSS KJ, FRANSZ P, JONES GH (1996). A light microscopic atlas of meiosis in *Arabidopsis thaliana*. *Chrom Res* 4(7): 507-516
- SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- SANGER F, NICKLEN S, COULSON AR (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467
- SANMIQUEL P, BENNETZEN JL (1998). Evidence that a recent increase in maize genome size was caused by the massive amplification of intergene retrotransposons. *Ann Bot* 81: 37-44

- SAVITSKY H (1975). Hybridization between *Beta vulgaris* and *B. procumbens* and transmission of nematode (*Heterodera schachtii*) resistance to sugar beet. Can J Genet Cytol 17: 197-209
- SAVITSKY H (1978). Nematode (*Heterodera schachtii*) resistance and meiosis in diploid plants from interspecific *Beta vulgaris* x *Beta patellaris* hybrids. Can J Genet Cytol. 20: 177-186.
- SAVITSKY H (1980). Nematode (*Heterodera schachtii*) resistance and meiosis in diploid *Beta vulgaris-procumbens* hybrids. Can J Genet Cytol 20, 177-187
- SCHLOTTERER C, TAUTZ D (1992). Slippage synthesis of simple sequence DNA. Nuc Acids Res 25; 20(2): 211-215
- SCHMIDT T (1998). Genome, Chromosomen und repetitive DNA-Modelle der Chromosomenstruktur und Sequenzevolution und ihre Anwendung in der Genomanalyse von Nutzpflanzen. Habilitationsschrift, Universität Kiel
- SCHMIDT T (1999). LINEs, SINEs and repetitive DNA: non-LTR retrotransposons in plant genomes. Plant Mol. Biol., 40: 903-910
- SCHMIDT T, BOBLENZ K, METZLAFF M, KAEMER D, WEISING K, KAHL G (1993). DNA fingerprinting in sugar beet (*Beta vulgaris*) - identification of double-haploid breeding lines. Theor Appl Genet 85: 653-657
- SCHMIDT T, HESLOP-HARRISON JS (1993). Variability and evolution of highly repeated DNA sequences of the genus *Beta*. Genome 36: 1074-1079
- SCHMIDT T, HESLOP-HARRISON JS (1996). High-resolution mapping of repetitive DNA by in situ hybridization: molecular and chromosomal features of prominent dispersed and discretely localized DNA families from the wild beet species *Beta procumbens*. Plant Mol Biol 30: 1099-1114
- SCHMIDT T, HESLOP-HARRISON JS (1998). Genomes, genes and junk: the large-scale organization of plant chromosomes. Trends Plant Sci 3: 195-199
- SCHMIDT T, JUNG C, HESLOP-HARRISON JS, KLEINE M (1997a). Detection of alien chromatin conferring resistance to the beet cyst nematode (*Heterodera schachtii* Schm.) in cultivated beet (*Beta vulgaris* L.) using in situ hybridization. Chrom Res 5: 186-193
- SCHMIDT T, JUNG C, METZLAFF M (1991). Distribution and evolution of two satellite DNAs in the genus *Beta*. Theor Appl Genet 82: 793-799
- SCHMIDT T, JUNGHANS H, METZLAFF M (1990). Construction of *Beta procumbens*-specific DNA probes and their application for the screening of *B. vulgaris* x *B. procumbens* (2n=19) addition lines. Theor Appl Genet 79: 177-181
- SCHMIDT T, KUBIS S, DESEL C, JUNG C, HESLOP-HARRISON JS (1997b). Molekulare Cytogenetik von Wild- und Kulturrüben der Gattung *Beta*. Vorträge Pflanzenzüchtung 37: 125-143
- SCHMIDT T, KUBIS S, HESLOP-HARRISON JS (1995). Analysis and chromosomal localization of retrotransposons in sugar beet (*Beta vulgaris* L.): LINE and Ty1-copia-like elements as major components of the genome. Chrom Res 3: 335-345.
- SCHMIDT T, KUBIS S, HESLOP-HARRISON JS, KAMM A, BRANDES A, DESEL C, DOUDRICK RL (1998). FISHing DNA sequences - fluorescent *in situ* hybridization in plant genome analysis. Scanning Microscopy International (im Druck)

- SCHMIDT T, KUBIS S, KATSIOTIS A, JUNG C, HESLOP-HARRISON JS (1998). Molecular and chromosomal organization of two DNA sequences with intercalary locations in sugar beet and other *Beta* species. *Theor Appl Genet* 97: 696-704
- SCHMIDT T, METZLAFF M (1991). Cloning and characterization of a *Beta vulgaris* satellite family. *Gene* 101: 247-250
- SCHMIDT T, SCHWARZACHER T, HESLOP-HARRISON JS (1994). Physical mapping of rRNA genes by fluorescent *in situ* hybridization and structural analysis of 5S rRNA genes and intergenic spacer sequences in sugar beet (*Beta vulgaris*). *Theor Appl Genet* 88: 629-636
- SCHONDELMAIER J, JUNG C (1997). Chromosomal assignment of the nine linkage groups of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) using primary trisomics. *Theor Appl Genet* 95: 590-596
- SCHONDELMAIER J, SCHMIDT T, HESLOP-HARRISON JS, JUNG C (1997). Genetic and chromosomal localization of the 5S rDNA in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Genome* 40: 171-175
- SCHRÖCK E, DU MANOIR S, VELDMAN T, SCHOELL B, WIENBERG J, FERGUSON-SMITH MA, NING Y, LEDBRETTER DH, BAR-AM I, SOENKENS S, GARNINI Y, RIED T (1996). Multicolor spectral karyotyping in human chromosomes. *Science* 273: 494-497
- SCHUBERT I, FRANZ PF, FUCHS J, DEJONG JH (2001). Chromosome painting in plants. *Meth Cell Sci* 23: 57-69
- SCHUELER MG, HIGGINS AW, RUDD MK, GUSTASHAW K, WILLARS HF (2001). Genomic and Genetic Definition of a Functional Human Centromere. *Science* 294: 109-115
- SCHWARTZ DC, CANTOR T (1984). Separation of yeast chromosome-sized DNA by pulse field gradient gel electrophoresis. *Cell* 37: 67-75
- SCHWARZACHER T (1994). Direct fluorochrome-labeled DNA probes for direct fluorescent *in situ* hybridization to chromosomes. *Methods Mol Biol* 28: 167-176
- SCHWARZACHER T; AMBROS P, SCHWEIZER D (1980). Application of Giemsa banding to orchid karyotype analysis. *Plant Syst Evol* 134: 293-291
- SCHWARZACHER T (1997). Three stages of meiotic homologous chromosome pairing in wheat: cognition, alignment and synapsis. *Sex Plant Reprod* 10: 324-331
- SCHWARZACHER T, ANAMTHAWAT-JONSSON K, HARRISON GE, ISLAM AKMR, JLA JZ, KING IP, LEITCH AR, MILLER TE, READER SM, ROGERS WJ, SHI M, HESLOP-HARRISON JS (1992). Genomic *in situ* hybridization to identify alien chromosomes and chromosome segments in wheat. *Theor Appl Genet* 84: 778-786
- SCHWARZACHER T, CRAM LS, MEYNE J, MOYZIS RK (1988). Characterization of human heterochromatin by *in situ* hybridization with satellite DNA clones. *Cytogenet. Cell Genet.* 47: 192-196
- SCHWARZACHER T, HESLOP-HARRISON JS (1992). *In situ* hybridization to plant telomeres using synthetic oligomers. *Genome* 34: 317-323
- SCHWARZACHER T, HESLOP-HARRISON JS (2000). „*Practical in situ Hybridisation*“ BIOS Scientific Publishers Ltd.; Bath Press, Bath, UK (ISBN 1 85996 138 X)
- SCHWARZACHER T, LEITCH AR, BENNET MD, HESLOP-HARRISON JS (1989). *In situ* localization of parental genomes in a wide hybrid. *Ann Bot* 64: 315-324.

- SCHWARZ-SOMMER, Z.; LECLERCP, L.; GÖBEL, E. & H. SAEDLER (1987). *Cin4*, an insert alternating the structure of the A1 gene in *Zea mays*, exhibits properties of non-viral retrotransposons. *EMBO J* 6: 3873-3880
- SHIBATA F, HIZUME M, KUROKI Y (1999). Chromosome painting of Y chromosomes and isolation of a Y chromosome-specific repetitive sequence in the dioecious plant *Rumex acetosa*. *Chromosoma* 108(4): 266-270
- SINGER M (1982). Highly repeated sequences in mammalian genomes. *Int Rev Cytol* 76: 67-112
- SMYTH DR (1991) Dispersed repeats in plant genomes. *Chromosoma* 100: 355-359
- SMYTH DR (1993). Plant retrotransposons, In *control of Gene Expression*, ed. DPS Verma. 1-15. London: CRC Press
- SMYTH DR, KALITSIS P, JOSEPH JL, SENTRY JW (1989). Plant retrotransposon from *Lilium henryi* is related to Ty3 of yeast and the gypsy group of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 5015-5019
- SOMERS DJ, ZHOU Z, BEBELI PJ, GUTSAFSON JP (1996). Repetitive, genome-specific probes in wheat (*Triticum aestivum* L. em Thell) amplified with minisatellite core sequences. *Theor Appl Genet* 93: 982-989
- SOUTHERN EM (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98: 503-517
- SPECKMANN GJ, DE BOCK TH SM, DE JONG JH (1985). Monosomic additions with resistance to beet cyst nematode obtained from hybrids of *Beta vulgaris* and wild *Beta* species of the section *Patellares*. I. Morphology transmission and level of resistance. *Z. Pflanzenzücht* 95: 74-83
- SPEICHER MR, GWYN BALLARD S, WARD DC (1996). Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Natur Genet.* 12: 368-375
- STAGINNUS C, HUETTEL B, DESEL C, SCHMIDT T, KAHL G (2001). A PCR-based assay to detect En/Spm-like transposon sequences in plants. *Chrom Res* 9(7):591-605
- STAGINNUS C, WINTER P, DESEL C, SCHMIDT T, KAHL G (1999) Molecular structure and chromosomal localization of major repetitive DNA families in the chickpea (*Cicer arietinum* L.) genome. *Plant Mol Biol* 39(5):1037-50
- STEFFENSEN K (1997). Genomkonstitution und Karyotypevolution in *Beta*-Arten der Sektionen *Corollinae* und *Procumbentes*. Diplomarbeit, Christian-Albrechts-Universität Kiel
- STRÄßBURGER E, NOLL F, SCHENCK H, SCHIMPER AFW (1983). Lehrbuch der Botanik. 32. Auflage. VEB Gustav Fischer Verlag Jena
- STUART-ROGERS C, FLAVELL AJ (2001). The evolution of Ty1-copia group retrotransposons in gymnosperms. *Mol Biol Evol* 18(2): 155-63
- SUZUKI T, IDE N, TANAKA I (1997). Immunocytochemical visualization of the centromeres during male and female meiosis in *Lilium longiflorum*. *Chromosoma* 106(7): 435-445
- SYBENGA J (1999). What makes homologous chromosomes find each other in meiosis? A review and an hypothesis. *Chromosoma* 108: 209-219

- TELENIUS H, CARTER PN, BEBB C E, NORDENSKÖLD M, PONDER BA, TUNNAcliffe A (1992). Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer: *Genomics* 13, 718-725
- TEN HOOPEN R., ROBBINS T, FRANSZ P, MONTIJN M, OUD J, GERATS A, NANNINGA N (1996). Localization of T-DNA inserts in *Petunia* by fluorescence in situ hybridisation: Physical evidence for suppression of recombination. *Plant Cell* 8: 823-830
- TOXOPEUS H, LUBBERTS H. (1979). Breeding for resistance to the sugar beet nematode (*Heterodera schachtii* SCHM.) in cruciferous crops. Proceeding in Eucarpis "Crucifera 1979" Conference, Wageningen: 151
- TRANZSCHEL W (1927). Die Arten der Gattung *Beta*. *Bull. Appl. Bot. and Pl. Breeding* (trudy) 17: 203-223
- TRAUT W (1991). Chromosomen. Klassische und molekulare Cytogenetik. Springer, Berlin
- TUTOIS S, CLOIX C, CUVILLIER C, ESPAGNOL MC, LAFLEURIEL J, PICARD G, TOURMENTE S (1999). Structural analysis and physical mapping of a pericentromeric region of chromosome 5 of *Arabidopsis thaliana*. *Chrom Res* 7: 143-156
- UENG PP, HANG A, TSANG H, VEGA JM, WANG L, BURTON CS, HE FT, LUI B (2000). Molecular analyses of repetitive DNA sequence in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genome* 43: 556-563
- ULBRICH E (1934). In: Engler A and Prantl K. (eds), *Natürliche Pflanzenfamilien*, 2nd ed., 16^e: 457-480
- VAN GEYT JPC, LANGE W, OLEO M, DE BOCK TH SM (1990). Natural variation within the genus *Beta* and its possible use for breeding sugar beet: A review. *Euphytica* 49: 57-76
- VERSHININ AV, DRUKA A, ALKHIMOVA AG, KLEINHOF A, HESLOP-HARRISON JS (2002). LINEs and gypsy-like retrotransposons in *Hordeum* species. *Plant Mol Biol* 49(1): 1-14
- VERSHININ AV, SCHWARZACHER T, HESLOP-HARRISON JS (1995). The large-scale genomic organization of repetitive DNA families at the telomeres of rye chromosomes. *Plant Cell* 7: 1823-1833
- VOYRAS DF.& AUSUBEL FM (1988). A copia-like transposable element family in *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 336:242-244.
- VOYTAS DF, CUMMINGS MP, KONIECZNY A, AUSUBEL FM (1992). *Copia*-like retrotransposons are ubiquitous among plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 89. 7124-7128
- WALBOT V (1999). UV-B damage amplified by transposons in maize. *Nature* 397, 398-399
- WALTER MY, HAWLEY RS (2000) Hanging on to your homolog: the roles of pairing, synapsis and recombination in the maintenance of homolog adhesion. *Chromosoma* 109. 3-9
- WANG ZX, KURATA SS, KATAYOSE Y, MINOBE Y (1995). A chromosome 5-specific repetitive DNA sequence in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet* 90: 907-913
- WATSON JD, CRICK FHC (1953). Molecular structure of nucleic acid. *Nature* 171: 731-732
- WESSLER SG (1996). Plant retrotransposons: Turned on by stress. *Curr Biol* 6, 959-961

- WIEGANT J, KALLE W, MULLENDERS L, BROOKES S, HOOVERS JMN, DAUWERSE JG, VAN OMMEN GJB, RAAP AK (1992). High-resolution in situ hybridisation using DNA halo preparations. *Hum Mol Genet* 1: 587-591
- WU KS, TANKSLEY SD (1993). Genetic and physical mapping of telomeres and macrosatellites of rice. *Plant Mol Biol* 22(5): 861-872
- XIONG Y, EICKBUSH TH (1990). Origin and evolution of retroelements based upon their reverse transcriptase sequence. *The Embo J* 33533362
- ZAKIAN VA (1995). Telomeres: beginning to understand the end. *Science* 8;270(5242): 1601-1607
- ZHANG FF, MURATA-COLLINS JL, GAYTAN P, FORMAN SJ, KOPECKY KJ, WILLMAN CL, APPELBAUM FR, SLOVAK ML (2000). Twenty-four-color spectral karyotyping reveals chromosome aberrations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Genes Chrom Cancer* 28(3): 318-328
- ZHONG X, FRANZ PF, WENNEKES-VAN EDEN J, RAMANNA MS, VAN KAMMEN A, ZABEL P, DE JONG JH (1998). FISH studies reveal the molecular and chromosomal organization of individual telomere domains in tomato. *Plant J* 13, 507-517
- ZHONG X., DE JONG JH, ZABEL P (1996). Localization of repetitive sequences on metaphase and pachytene chromosomes of tomato using fluorescence in situ hybridisation. *Chrom Res* 4: 24-28
- ZHONG X., FRANZ PF, WENNEKES- VAN EDEN J, ZABEL P, VAN KAMMEN A, DE JONG JH (1996). High resolution mapping on pachytene chromosomes and extended DNA fibres by fluorescence in situ hybridisation. *Plant Mol Biol Rep* 14: 232-242.
- ZICKLER D, KLECKNER N (1999). Meiotic chromosomes: integrating structure and function. *Ann Rev Genet* 33: 603-754
- ZWICK MS; ISLAM-FARIDI MN; CZECHIN DG, WING JRA; HART GE (1998). Physikal mapping of the linguleless linkage group in *sorghum bicolor* using rice selected RFLP Sorghum BACs *Genetics* 148: 1983-1993

8. Lebenslauf

Christine Desel

geboren am 15.11.1964 in Kassel

Schulbildung

1971 - 1975	Grundschule Immenhausen (Hessen)
1975 - 1981	Freiherr von Stein-Gesamtschule Immenhausen
1981 - 1984	Gymnasiale Oberstufe der Albert-Schweizer-Schule Hofgeismar
14.06.1984	<i>Allgemeine Hochschulreife</i>

Wissenschaftliche Ausbildung

10/1985 - 05/1992	Studium der Biologie an der Georg-August-Universität Göttingen
12.05.1992	Diplom
	<i>Prüfungsfächer:</i> Biochemie, Mikrobiologie, Physikalische Chemie
	<i>Diplomarbeit:</i> bei Prof. Dr. K. von Figura im Biochemischen Institut der medizinischen Fakultät der GAU-Göttingen
	<i>„Immunisierung von Vesikeln mit Hilfe von Antikörpern gegen den 46kD Mannose- 6-Phosphat-Rezeptor und der lysosomalen sauren Phosphatase.“</i>

Wissenschaftliche Tätigkeiten

04/1994-6/1996	Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Klinischen Pharmakologie des Zentrums Pharmakologie und Toxikologie- Göttingen (AG Prof. Dr. U. Gundert-Remy)
8/1996-11/1996	Praktikum am Biochemischen Institut der medizinischen Fakultät der CAU-Kiel (AG Prof. Dr. V. Gieselmann)
12/1996-12/2000	Wissenschaftliche Angestellte am Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung der CAU-Kiel, Erarbeitung der experimentellen Daten für die vorliegende Dissertation (AG Prof. Dr. C. Jung & PD Dr. T. Schmidt)
09/2001-08/2002	Wissenschaftliche Angestellte am Institut für Humanernährung und Lebensmittelkunde der CAU-Kiel (AG Prof. Dr. H. Erbersdobler & Dr. V. Faist)

Weitere Tätigkeiten

11/1992-heute	Betreuung meiner Tochter Jule
08/1984-09/1985	Ausbildung zur Chemielaborantin in der Hessischen Landwirtschaftlichen Versuchsanstalt- Kassel

8. Danksagung

Für die interessante Themenstellung, die hervorragende Betreuung, für die vielen wertvollen Anregungen und inhaltlichen Diskussionen als auch für die freundschaftliche Zusammenarbeit möchte ich Herrn PD Dr. T. Schmidt ein großes Dankeschön aussprechen.

Herzlichen Dank Frau Prof. Dr. K. Krupinska für die Übernahme des Referats.

Ich danke Herrn Prof. Dr. C. Jung für die hervorragende Möglichkeit zur wissenschaftlichen Arbeit am Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung der Universität Kiel.

Für die gute und erfolgreiche Kooperation bei der gemeinsamen Bearbeitung von unterschiedlichsten Fragestellungen bedanke ich mich bei Frau Dr. C. Staginnus, Frau Dr. S. Kubis und Frau Dr. I. Galasso.

Bei Herrn Dr. D. Cai und Herrn PD Dr. M. Kleine möchte ich mich für die zur Verfügung gestellten Plasmidklone und YACs, ohne die die chromosomale Lokalisierung des Nematodenresistenzgens nicht möglich gewesen wäre, herzlich bedanken.

Für die sorgfältige Durchsicht und Korrektur des Manuskript danke ich mich bei Herrn Dr. G. Jakobs, Herrn Dr. U. Matzner und Frau B. Fleischer.

Bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Molekulare Cytologie insbesondere Frau R. Jansen, Frau M. Groszek, Frau N. Pinnow, Frau D. Dechyeva und Frau K. Steffensen bedanke ich mich für die gute und konstruktive Zusammenarbeit, Hilfsbereitschaft und nette Arbeitsatmosphäre.

Für die vielfältige Unterstützung und Aufmunterung sei allen Freunden und Freundinnen, Mitbewohnern und Mitbewohnerinnen gedankt.

Das letzte und dennoch wichtigste Dankeschön an Jule für ihre Geduld, ihr Verständnis und ihre Hilfe.