

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Stammlösungen

Wenn nicht anders erwähnt, wurden alle Chemikalien in *aqua bidest.* gelöst und die Stammlösungen anschließend 15 min bei 121 °C und 200 kPa autoklaviert.

5 x TBE:	0,45 M Tris-Borat 10 mM EDTA pH-Wert 7,4
20 x SSC:	3 M NaCl 0,3 M Tri-Natrium-Citrat pH-Wert 7,0
10 x PBS:	1,3 M NaCl 70 mM Na ₂ HPO ₄ 30 mM NaH ₂ PO ₄ pH-Wert 7,4
dNTP-Mix:	2,5 mM dATP 2,5 mM dCTP 2,5 mM dGTP 2,5 mM dTTP
10 x Enzypuffer: (SCHWARZACHER & HESLOP-HARRISON 2000)	40 mM Citronensäure 60 mM Tri-Natrium-Citrat pH-Wert 4,6
Lachs-DNA:	10 mg Lachs-DNA/ml sonifiziert auf Fragmentgrößen von 50-1500 bp (nicht autoklaviert)
10 x Blockingreagenz :	10 % Blockierungsreagenz (Roche, Mannheim) in Maleinsäurepuffer (100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, pH-Wert 7,5) (nicht autoklaviert)

2.2 Pflanzenmaterial

Ausgangsmaterial für die Versuche bildeten die anfälligen Sorten *Brassica napus* cv. ‚Ceres‘ (Winterraps, Nachbau IAG) und *Brassica napus* cv. ‚Loras‘ (Sommerwinterraps, Nachbau IAG) sowie folgende putative Resistenzdonoren aus der Tribus *Brassicaceae*: *Brassica elongata* ssp. *integrifolia*, *B. oxyrrhina*, *B. maurorum*, *B. oxycam* [= synthetische Allopoloide aus *B. oxyrrhina* und *B. campestris* (= *B. rapa*)], *Diplotaxis tenuifolia* (zwei Akzessionen), *D. eruroides* (zwei Akzessionen), *Hirschfeldia incana* und *Sinapis alba* cv. ‚Emergo‘. Herkunft sowie Chromosomenzahlen und in der Literatur beschriebene Resistenz gegen *Alternaria* spp. der putativen Resistenzdonoren sind in Tabelle 2.1 zusammengefasst.

Tab. 2.1: Herkunft, Chromosomenzahl und Resistenzausprägung verschiedener putativer Resistenzdonoren aus der Familie *Brassicaceae* (A = Akzession).

Art	Chromosomenzahl	Herkunft [Sortimentnummer]	Resistenzeigenschaften
<i>B. elongata</i> Ehrh. ssp. <i>integrifolia</i> (Boiss.)	2n = 22 (MANTON 1932)	IPK ² Gatersleben/ [BRA1281 (D4179)]	resistent (PLÜMPER 1995)
<i>B. oxyrrhina</i> (Coss.) Willk.	2n = 18 (BERTOLI 1967)	IPK ² Gatersleben [K10128]	resistent (SRINIVASAN <i>et al.</i> 1998)
<i>B. maurorum</i> Dur.	2n = 16 (HARBERD 1976)	IPK ² Gatersleben [K9241]	resistent (CHRUNGU <i>et al.</i> 1999)
<i>B. oxycam</i>	2n = 38	Indien ¹	resistent (S. PRAKASH, pers. Mitteilung)
<i>D. tenuifolia</i> (L.) DC. A _{IPK} und A _{Indien}	2n = 22 (MANTON 1932)	IPK ² Gatersleben [DIPLO6 (D5915)]/ Indien ¹	jeweils resistent/sensitiv ⁴ (WESTMAN <i>et al.</i> 1999)
<i>D. eruroides</i> (L.) DC. A _{IPK} und A _{Indien}	2n = 14 (JARETKY 1932)	IPK ² Gatersleben [DIPLO2 (D3710)]/ Indien ¹	resistent (SHARMA <i>et al.</i> 2002)
<i>H. incana</i> (L.) Lagr.- Foss.	2n = 14 (BAEZ-MAYOR 1934)	IPK ² Gatersleben [HIR3 (K6439)]	<i>A. brassicae</i> resistent/ <i>A. brassicicola</i> sensitiv (SCHOLZE & HAMMER 1998)
<i>S. alba</i> (L.) cv. ‚Emergo‘	2n = 24 (KARPETCHENKO 1924)	Nachbau IAG ³	resistent (KOLTE 1985)

¹ Dr. S. Prakash, National Research Centre on Plant Biotechnology, Indian Agricultural Research Institute, New Delhi, Indien

² Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung Gatersleben, Genbank

³ Institut für Biologie - Angewandte Genetik, Freie Universität Berlin

⁴ Innerhalb der Akzession wurden sowohl resistente als auch anfällige Individuen beobachtet

Zusätzlich zur bereits erwähnten *S. alba* cv. ‚Emergo‘ wurden 18 weitere *S. alba*-Akzessionen aus dem Gaterslebener Sortiment mit unterschiedlichen Resistenzausprägungen untersucht. Die Sortennamen und Sortimentnummern sowie das in der Literatur beschriebene Verhalten gegenüber *Alternaria* spp. sind in Tabelle 2.2 aufgeführt.

Tab. 2.2: Sortennamen, Sortimentnummern und Resistenzniveau der verwendeten *S. alba*-Akzessionen (S = anfällig, R = resistent).

S. alba (Sortimentnummer und Sortenname)	Befallsprozent¹ (IPK Gatersleben)
CR 1815/90: <i>S. alba</i> „Maxi“	24,0 %
CR 1820/90: <i>S. alba</i> „Perine“	35,0 %
CR 1808/79a: <i>S. alba</i> „Galben de Craiova“	94,0 %
CR 1840/90a: <i>S. alba</i>	90,6 %
CR 1810/92: <i>S. alba</i> „Kastor“	90,0 %
CR 1830/90: <i>S. alba</i> „Valiant“	85,4 %
	Boniturnote (0-9)² (IPK Gatersleben)
CR 1804/80: <i>S. alba</i>	2,56
CR 1829/90b: <i>S. alba</i> „Trico“	3,20
CR 1819/90: <i>S. alba</i> „Nakielska“	3,52
	Bonitur (P. SCHOLZE, pers. Mitteilung)
CR 2046/89: <i>S. alba</i> „Waldmanns Halloren“	S
CR 514/95b: <i>S. alba</i>	S
CR 1825/90: <i>S. alba</i> „serval“	R
CR 1824/95: <i>S. alba</i> „seco“	R
CR 2035/82: <i>S. alba</i> „Mansholt“	R
	Keine Angaben
CR 1814/90a: <i>S. alba</i> „Mansholt's“	-
CR 2088/95: <i>S. alba</i>	-
CR 2076/91: <i>S. alba</i>	-
SIN 73/95: <i>S. alba</i> L. ssp. mairei (Lindb.) Maire	-
SIN 78/94: <i>S. alba</i> L. ssp. mairei (Lindb.) Maire	-

¹ bezogen auf die Blattfläche² 0 = resistent, 9 = anfällig

Weiterhin standen 65 asymmetrische somatische Hybriden aus *S. alba* cv. ‚Emergo‘ und *B. napus* cv. ‚Ceres‘ sowie eine F₁-Hybride aus der Kreuzung *B. napus* cv. ‚Loras‘ x *B. elongata* ssp. *integrifolia* (PLÜMPER 1995) zur Verfügung.

B. napus cv. ‚Ceres‘ und *B. napus* cv. ‚Loras‘ wurden als anfällige Kontrollen in Resistenztests sowie als Rückkreuzungseltern eingesetzt. Zur Blühinduktion wurden alle Nachkommen aus Kreuzungen mit *B. napus* cv. ‚Ceres‘ für sechs Wochen bei 4 °C vernalisiert.

2.3 Allgemeine Kulturbedingungen

Für die Kultur von Pflanzen in Erde standen zwei Standorte mit unterschiedlichen Bedingungen zur Verfügung.

Die Anzucht der Pflanzen (aus Saatgut oder nach Transfer aus *in vitro*-Kultur in Erde) fand in der Klimakammer statt. Hier wurde auf Pflanzenschutz weitestgehend und auf Fungizideinsatz komplett verzichtet. Nach 4-6 Wochen wurden die jungen Pflanzen auf *Alternaria*-Resistenz getestet. Erst im Anschluss daran wurden die Pflanzen für weitere Experimente ins Gewächshaus transferiert, wo regelmäßig Pflanzenschutz durchgeführt wurde. Wenn notwendig, wurden die Pflanzen sechs Wochen bei 4 °C und Dauerlicht (ca. 400 Lux) vernalisiert, um eine Blühinduktion zu erreichen.

Die Kulturbedingungen von Gewächshaus und Klimakammer sind in Tabelle 2.3 aufgeführt.

Tab. 2.3: Kulturbedingungen im Gewächshaus und in der Klimakammer.

Gewächshaus	Klimakammer
Langtagbedingungen (16 h Licht) (September bis April Zusatzlicht: Osram HQIT 400, 14000 Lux)	Langtagbedingungen (16 h Licht) Langtagbedingungen (16 h Licht: Osram HQ/E, 9000 Lux)
mindestens 18 °C	22-26 °C tagsüber 20 °C nachts 80 % relative Luftfeuchtigkeit

Die pflanzliche *in vitro*-Kultur fand im Kulturraum statt. Dieser wurde bei 22 °C und 14 h Beleuchtungsdauer mit einer Lichtstärke von 3000-5000 Lux (Philips TLD, 50W 83HF) betrieben.

2.4 Pflanzenanzucht aus Saatgut

Samen wurden zunächst in Petrischalen auf zwei Lagen nassem Filterpapier (MN 615, Roth) ausgelegt und vier Tage bei Tageslicht und RT kultiviert.

Die gekeimten Pflanzen wurden anschließend in Tontöpfe (5 cm Ø) mit Einheitserde P + 10 % (v/v) Kristall-Quarzsand pikiert und nach der Durchwurzelung in Vierkant-Plastiktöpfe (9 bis maximal 14 cm) mit Einheitserde T + 15 % (v/v) Kristall-Quarzsand überführt.

2.5 Kreuzungen und pflanzliche *in vitro*-Kultur

2.5.1 Inter- und intraspezifische Kreuzungen

Ca. 6 mm lange Knospen wurden kurz vor der Anthese mit einer spitzen Pinzette geöffnet und die unreifen Antheren herauspräpariert. Bereits entfaltete Blüten sowie noch sehr kleine Knospen (≤ 4 mm) desselben Blütenstandes wurden entfernt, so dass, je nach Genotyp, zwischen sechs und zehn Knospen pro Blütenstand kastriert wurden. Die Narben wurden sofort im Anschluss mit dem Pollen des Kreuzungspartners bestäubt und durch eine Cellophantüte bis zum Blühende (1-2 Wochen) vor Fremdbestäubung geschützt. Die Fruchtsände aus *intraspezifischen* Kreuzungen wurden zum Abreifen an der Pflanze gelassen, während nach *interspezifischen* Kreuzungen und deren Rückkreuzungen die unreifen Schoten ein bis zwei Wochen nach der Bestäubung abgenommen wurden (Kapitel 2.5.4.2).

2.5.2 Selbstungen/Knospenbestäubungen

Neben inter- und intraspezifischen Kreuzungen wurden auch erzwungene Selbstungen durchgeführt. Hierfür wurden alle bereits geöffneten Knospen entfernt und der Blütenstand anschließend mit einer Cellophantüte bis zur Abblüte abgedeckt. Diese Technik wurde vor allem für den Nachbau von Saatgut der Ausgangs- und Referenzsorten, aber auch zur Bestimmung der Fertilität (siehe Kapitel 2.9) angewandt.

Die meist schwach fertilen Kreuzungs- und frühen Rückkreuzungsnachkommen aus interspezifischen Kreuzungen zeigten oft keinen oder nur geringen Samenansatz nach Selbstung. Die Ausbeute konnte jedoch durch Knospenbestäubung gesteigert werden: Hier wurden die noch geschlossenen Knospen mit einer Pinzette geöffnet und die Narbe mit Pollen eines anderen Blütenstandes derselben Pflanze bestäubt.

2.5.3 Pflanzenanzucht nach intraspezifischen Kreuzungen

Die reifen Samen aus intraspezifischen Kreuzungen wurden wie in Kapitel 2.4 beschrieben angezogen.

2.5.4 *In-vitro*-Kulturtechniken nach interspezifischen Kreuzungen

2.5.4.1 Nährmedien für die pflanzliche *in vitro*-Kultur

Wenn nicht anders erwähnt, wurden alle Kreuzungen und Rückkreuzungen mittels *embryo rescue* erstellt. Die Medien wurden nach SACRISTÁN & GERDEMANN (1986; MS11, G1) und INOMATA (1985) hergestellt. Die Gewebekulturen wurden im Lichtkeller bei 22 °C, 16 h Licht und einer Lichtstärke von 3000-5000 Lux gehalten.

In Tabelle 2.4 ist die Zusammensetzung der verwendeten pflanzlichen Kulturmedien aufgeführt. Alle Medien wurden in *aqua dest.* angesetzt, auf einen pH-Wert von 5,75 eingestellt, durch Zugabe von Agar Agar bzw. Gelrite verfestigt und 15 min autoklaviert (121°C, 200 kPa).

Die Basalmedien folgen den Angaben von NITSCH & NITSCH (1969; Inomata-Medium), MURASHIGE & SKOOG (1962; MS11-Medium) und GAMBORG *et al.* (1968; G1-Medium).

Tab. 2.4: Zusammensetzung der Kulturmedien.

	Inomata (INOMATA 1985)	MS2	MS11 (SACRISTÁN & GERDEMANN 1986)	G1 (SACRISTÁN & GERDEMANN 1986)
	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l
Makroelemente				
KNO ₃	950	1900	1900	1900
NH ₄ NO ₃	720	1650	1650	1650
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	166	440	440	440
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	185	370	370	370
KH ₂ PO ₄	68	170	170	170
Na ₂ EDTA x 2 H ₂ O	37,3	37,3	37,3	37,3
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	27,8	27,8	27,8	27,8
Mikroelemente				
H ₃ BO ₃	10	6,2	6,2	6,2
MnSO ₄ x 4 H ₂ O	25,0	16,9	22,3	22,3
ZnSO ₄ x 4 H ₂ O	10	10,5	8,6	8,6
KJ		0,83	0,83	0,83
Na ₂ MoO ₄ x 5 H ₂ O	0,25	0,25	0,25	0,25
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,025	0,025	0,025	0,025
CoCl ₂ x 6 H ₂ O		0,025	0,025	0,025
Organische Bestandteile				
Nicotinsäure	5,0	0,5	0,5	1,0
Pyridoxin x HCl	0,5	0,5	0,5	1,0
Thiamin x HCl	0,5	0,1	0,1	10
Folsäure	0,5			
Biotin	0,05			
myo-Inositol	100	100	100	100
Glycin	2,0	2	2,0	2,0
Caseinhydrolysat	300			
Hormone				
TDZ		10		
NAA		10		0,2
Saccharose in g/l	50	10	10	30
Agar Agar (Bitek) in g/l			8	9
Gelrite (Roth) in g/l	3,5	3		

2.5.4.2 Ovarien- und Embryokultur (*embryo rescue*)

Sich entwickelnde Schoten wurden ein bis zwei Wochen nach der Bestäubung abgenommen und 15 min in 20 % NaOCl (v/v einer technischen Lösung mit ca. 3,7 % aktivem Chlor) mit einigen Tropfen Tween 20[®] sterilisiert, dann kurz in 70 % Ethanol getaucht und dreimal in sterilem *aqua dest.* gewaschen. Anschließend wurden die Schoten in kleinen Kulturgläsern (Ø 9 cm) mit Inomata-Medium ca. sieben Tage kultiviert (Ovarienkultur).

Zwei bis drei Wochen nach der Bestäubung wurden gut entwickelte Schoten mit einem Mikroskalpell an der Verwachsungsnaht geöffnet, die Samen bzw. Samenanlagen wurden möglichst unverletzt herauspräpariert, auf MS11-Medium in kleine Kulturgläser (Ø 9 cm) gesetzt und im Kulturraum gehalten (Embryokultur). Nach vier bis zwölf Wochen entwickelten sich Keimlinge oder Kallusse, aus denen, teilweise erst nach mehreren Subkulturen auf MS11- und/oder G1-Medium, normale Sprosse regeneriert werden konnten. Die Bewurzelung der Sprosse fand im Kulturraum auf G1-Medium in großen Kulturgläsern (0,5 l Rundrandgläser 100, Weck) statt.

2.5.5 Erhaltung von *in vitro*-Sprosskulturen

Um alle Genotypen auch als *in vitro*-Klon zu erhalten, wurde vor dem Transfer in Erde jeweils die Sprossspitze (unterhalb des obersten Nodiums mit 2-3 Blättern) mit einem Skalpell abgetrennt und zur Bewurzelung auf neues G1-Medium überführt. Nur der verbleibende, untere Sprossabschnitt wurde anschließend in Erde transferiert.

2.5.6 Transfer von *in vitro*-Kulturen in Erde

Gut bewurzelte *in vitro*-Pflanzen wurden von Medium sowie von welken Blättern befreit und in Tontöpfe (Ø 5 cm) mit Einheitserde P + 20 % (v/v) Kristall-Quarzsand überführt. Für die spätere Abnahme frischer Wurzelspitzen für cytologische Untersuchungen wurden die Wurzeln bis auf 1-2 cm zurückgeschnitten. Die Pflanzen wurden zunächst für ca. sieben Tage unter einer Plastikhaube gehalten, um eine Adaptation an die geringere Luftfeuchtigkeit im Gewächshaus bzw. in der Klimakammer zu ermöglichen.

2.5.7 Regeneration von Pflanzen aus Pflanzenteilen

Für den Rücktransfer von Gewächshauspflanzen *in vitro* wurden von adulten Pflanzen in Erde Stängelstücke von Seitensprossen entnommen, 10 min in 5%igen NaOCl (v/v einer technischen Lösung mit ca. 3,7 % aktivem Chlor) sterilisiert und kurz in 96%igen Ethanol getaucht. Nach zweimaligem Spülen mit *aqua dest.* wurde jedes Stängelstück in ca. 4 mm dicke Scheiben geschnitten und auf MS2-Medium in Petrischalen (Ø 5 cm) gegeben. Die Explantate wurden mit einem Tuch abgedeckt und im Kulturraum gehalten. Regenerierende Sprosse wurden zunächst auf MS11- und zur Sprossbewurzelung auf G1-Medium transferiert und weiterkultiviert.

2.5.8 Stecklingsvermehrung

Zur Vervielfältigung interessanter Genotypen wurden Stecklinge hergestellt, indem junge Seitentriebe von adulten Pflanzen mit einer Rasierklinge in ca. 6 cm lange Stücke mit jeweils mindestens einer Blattknospe geschnitten wurden. Die basale Schnittstelle wurde zur schnelleren Bewurzelung in RHIZOPON[®] B (0,1 % 1-Naphtylelessigsäure) getaucht. Der Spross wurde dann in gut befeuchtete Erde gesetzt und mit einer Plastikhaube als Verdunstungsschutz für 1-2 Wochen bis zur Ausbildung von Wurzeln abgedeckt.

2.6 Pathogenmaterial und Kultivierung von *Alternaria* spp.

2.6.1 Nährmedien für *Alternaria* spp.

Modifiziertes V8-Medium (1 Liter)

(MILLER 1955)

100 ml V8 oder vergleichbarer Gemüsesaft

0,04 g Rose Bengal

9 g Agar Agar (DIFCO/BiTek)

pH-Wert 5,5

300 mg Streptomycinsulfat

SNA-Medium (1 Liter)1 g KN_2PO_4 1 g KNO_3 0,5 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$

0,5 g KCl

0,2 g Glucose

0,2 g Saccharose

0,6 ml 1 N NaOH

22 g Agar (Roth)

100 mg Penicillin

10 mg Chlortetracyclin

50 mg Streptomycinsulfat

Antibiotika wurden sterilfiltriert (Sterilfilter der Firma Schleicher & Schuell, Dassel mit den Porengrößen 0,2 oder 0,4 μm) und den jeweiligen Medien nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 50 °C zugegeben.

2.6.2 Verwendete *Alternaria*-Isolate

Die Isolate der verschiedenen *Alternaria* ssp. (Tab. 2.5) stammen aus den Sortimenten der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin (BBA). Sie wurden dauerhaft in steriler Erde bei 4 °C oder, im Fall von *A. brassicicola*, zusätzlich in Form von Sporensuspensionen in sterilem *aqua bidest.* bei -20 °C gelagert. Über einige Monate konnten die Isolate auch auf SNA-Medium mit aufgelegten ca. 4 cm^2 großen sterilen Zellulose-Filtern (MN 615, Roth) erhalten werden.

Tab. 2.5: Verzeichnis der verwendeten Pathogene (BBA).

Art	Isolat-Nr.	isoliert von
<i>Alternaria brassicae</i>	63194	Keine Angaben
<i>Alternaria brassicae</i>	64878	<i>B. napus</i>
<i>Alternaria brassicicola</i>	62008	<i>B. rapa</i>
<i>Alternaria brassicicola</i>	62009	<i>B. oleracea</i>

2.6.3 Herstellung von Dauererdkulturen

Zur langfristigen Aufbewahrung und Erhaltung der *Alternaria*-Isolate wurde Erde (2 Teile Lehm; 1,5 Teile Komposterde; 1 Teil Sand) luftgetrocknet, gesiebt und anschließend mit Leitungswasser vermengt. Das Gemisch wurde ca. 6 cm hoch in Reagenzröhrchen gefüllt und mit 2 ml Leitungswasser aufgefüllt, so dass die Erde gut feucht, aber nicht verschlemmt war. Zur Sterilisation wurden die Röhrchen 30 min bei 121 °C und 200 kPa autoklaviert.

Die Erde wurde mit einem ca. 0,3 cm² großen Stück SNA-Agar einschließlich Pilzhyphen und evtl. -sporen beimpft und anschließend bei 4° C gelagert. Die Kultur wurde alle 3-4 Monate mit sterilem *aqua dest.* angefeuchtet, um eine Austrocknung des Pilzes zu vermeiden.

2.6.4 Herstellung von Inokulum

2.6.4.1 Herstellung einer *A. brassicicola*-Sporensuspension

Petrischalen (Ø 5 cm) mit modifiziertem V8-Medium wurden mit *A. brassicicola* von SNA-Platten, aus Dauererdkulturen oder aus Sporensuspensionen beimpft und zunächst 72 h im Dunkeln gehalten, um eine ausreichende Hyphenbildung zu gewährleisten. Die Sporulation wurde durch langwelliges UV-Licht (Philips TLD 36/08, Dauerlicht) induziert. Nach zwei bis drei Wochen wurden die Sporen mit ca. 2 ml sterilem *aqua bidest.* durch vorsichtiges Schaben mit einer Impföse und leichtes Schütteln der Petrischale vom Medium gewaschen und durch Gaze (100 µm Maschenweite) gefiltert. Die Dichte der Sporen wurde mittels einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt und zur Inokulation von Pflanzenmaterial auf 5×10^5 Sporen/ml eingestellt. Sporensuspensionen von *A. brassicicola* konnten bei -20 °C über einige Jahre gelagert werden.

2.6.4.2 Herstellung eines *A. brassicae*-Inokulums

Petrischalen (Ø 9 cm) mit modifiziertem V8-Agar wurden mit jeweils 15-20 sterilen, ca. 0,5 cm² großen Filterpapierstücken ausgelegt und mit *A. brassicae* beimpft. Nach dreitägiger Hyphenbildung im Dunkeln bei Raumtemperatur wurden die Platten zur Sporulation des Pilzes unter UV-Licht transferiert und drei bis sechs Wochen inkubiert, bis das Filterpapier von einem dichten Sporenrasen bedeckt war. Die Filterstückchen wurden vorsichtig mit einer Pinzette vom Medium abgelöst und als Inokulum verwendet.

2.7 Prüfung auf Resistenz gegen *Alternaria* spp.

2.7.1 Test an Blattscheiben (PLÜMPER 1995)

Mit einem Korkbohrer wurden Blattscheiben (\varnothing 1,5 cm) aus möglichst alten, aber vitalen Blättern gestanzt und mit der Blattunterseite auf Filterpapier in Glaspetrischalen (\varnothing 9 cm) mit 6 ml einer 2,4-D-Lösung (1 mg/l 2,4-D) gelegt. Auf jede Blattscheibe wurden 10 μ l Sporensuspension (5×10^5 Sporen/ml) aufgebracht. Als Kontrolle dienten steriles *aqua bidest.* (Wasserkontrolle) sowie inokulierte Blattscheiben von *B. napus* cv. ‚Ceres‘ (anfällige Kontrolle). Die Petrischalen wurden mit Parafilm verschlossen und bei diffusem Licht (ca. 400 Lux) 3-4 Tage bei ca. 22 °C inkubiert.

Zur Auswertung wurden die durch den Pilz hervorgerufenen Läsionen in fünf Klassen bonitiert: RR, R, (R), S-R und S (Tab. 2.6 und Abb. 2.1).

Tab. 2.6: Boniturstufen des Blattscheibentests nach Inokulation mit *A. brassicicola*.

Bonitur	Symptome
RR	Makroskopisch keine Veränderungen, kein Unterschied zur Wasserkontrolle
R	Kleine schwarze Nekrose direkt unter dem applizierten Tropfen
(R)	Nekrose geht leicht über den Tropfen hinaus
S-R	Nekrose geht über den Tropfen hinaus, ist aber kleiner als bei der anfälligen Kontrolle
S	Nekrose geht weit über den Tropfen hinaus, Läsionsgröße erreicht die der anfälligen Kontrolle

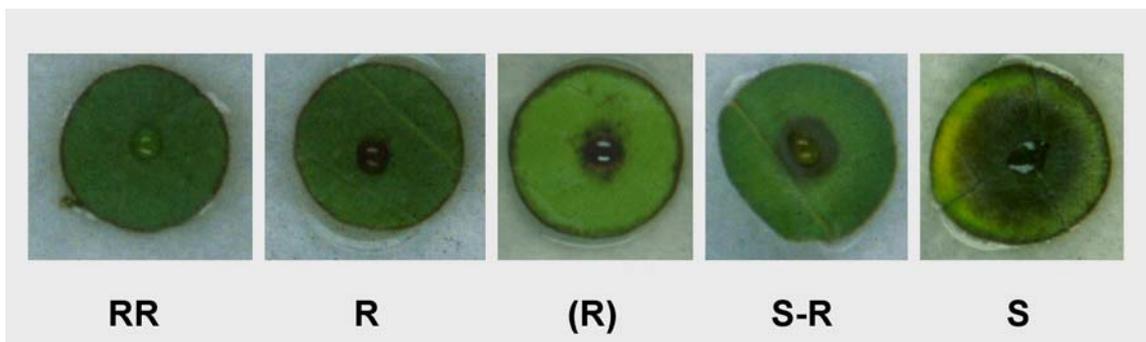


Abb. 2.1: Bonitur des Blattscheibentests.

2.7.2 Test an der intakten Pflanze (Feuchtkammertest)

Die zu testende, ca. vier Wochen alte Pflanze wurde an den drei ältesten, noch vitalen Blättern an jeweils drei blattaderfreien äquidistanten Stellen mit einer Lanzettnadel strichförmig verletzt und jede Verletzung mit 5 µl einer *A. brassicicola*-Sporensuspension („Tröpfchenmethode“ = Standardmethode) bzw. einem mit *A. brassicae* bewachsenen Stück Filterpapier („Plättchenmethode“) inokuliert. Die Durchmesser der durch das Pathogen verursachten Läsionen wurden nach sieben, elf und 14 Tagen Inkubation in der Feuchtkammer (ein mit Plastikfolie umspanntes Holzgerüst, Aufbau in Abb. 2.2) bei nahezu 100 % Luftfeuchtigkeit bestimmt. Der Mittelwert aus neun Läsionen pro Pflanze wurde jeweils in Relation zu den durchschnittlichen Läsionsgrößen sowohl des anfälligen als auch des resistenten Elters gesetzt, woraus ein Relativer Läsionsindex (RL) von 0-1 errechnet (Formel in Abb. 2.3) und die Pflanzen in die drei Klassen S (Anfälligkeit), S-R (intermediäre Resistenz, die in der Ausprägung zwischen der der beiden Eltern liegt) und R (Resistenz) bonitiert werden konnten (Abb. 2.4 und Abb. 2.5). Ein RL von 0-0,2 entsprach der Bonitur R, ein RL von 0,21 bis 0,8 der Bonitur S-R und ein RL ab 0,81 der Bonitur S. Die Umrechnung der Läsionsgröße in einen RL-Wert erlaubt den direkten Vergleich von Ergebnissen aus verschiedenen unabhängigen Tests, in denen die Läsionsgrößen der Elternarten, bedingt durch im Gewächshaus schwankende Umweltbedingungen wie Temperatur und Luftfeuchtigkeit, variieren konnten. Putativ resistente Pflanzen wurden mindestens drei unabhängigen Testwiederholungen unterzogen.



Abb. 2.2: Feuchtkammertest: Aufbau einer Feuchtkammer.

$$RL = \frac{(LD_{\text{Nachkomme}} - LD_{\text{R-Elter}})}{(LD_{\text{S-Elter}} - LD_{\text{R-Elter}})}$$

Abb. 2.3: Formel zur Errechnung des Relativen Läsionsindex RL (LD: durchschnittlicher Läsionsdurchmesser in % von *B. napus* cv. ‚Ceres‘).

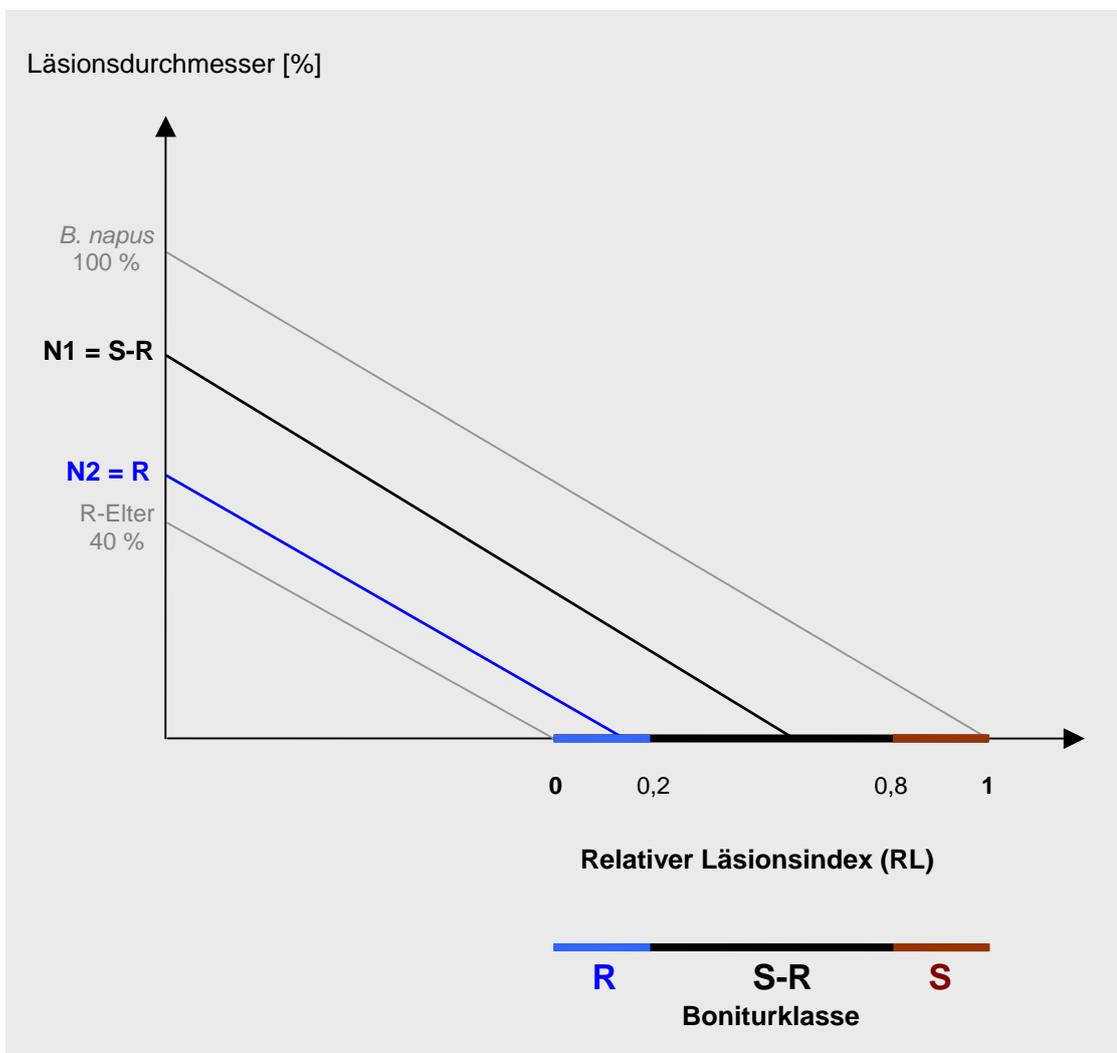


Abb. 2.4: Schematische Darstellung des Relativen Läsionsindex (RL), exemplarisch für einen resistenten Elter mit einer durchschnittlichen Läsionsgröße von 40 % der durchschnittlichen Läsionsgröße von *B. napus* cv. ‚Ceres‘ (N1 und N2 = fiktive Kreuzungsnachkommen).

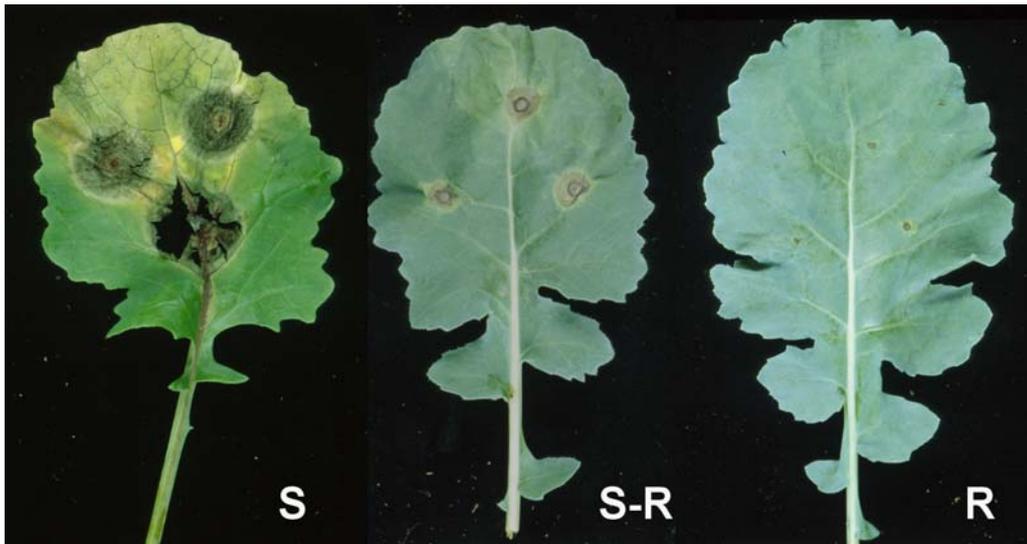


Abb. 2.5: Beispiele für die drei Boniturklassen S, S-R und R nach Inokulation mit *A. brassicicola* und siebentägiger Inkubation in der Feuchtkammer (links: *B. napus* cv. ‚Ceres‘).

2.7.3 Resistenztest an Schoten

Bei Pflanzen mit gutem Selbstungsansatz konnten zusätzlich Resistenztests an abgetrennten Schoten durchgeführt werden. Hierfür wurden von jeder zu testenden Pflanze sechs bis neun gut entwickelte Schoten abgenommen, mit einer Lanzettnadel strichförmig verletzt und mit 5 µl einer *A. brassicicola*-Sporensuspension inokuliert. Im Anschluss wurde jede infizierte Schote vertikal in ein Schraubglas (Glaszentrifugenröhrchen, 30 ml) mit H₂O-Agar [4 g/l Gelrite (Roth), pH-Wert 5,75] gesetzt. Die Auswertung erfolgte nach drei und nach sieben Tagen, und die Schoten wurden in die Klassen S, S-R und R bonitiert. Wenn die Wuchshöhe der Pflanze bei Frucht reife es erlaubte, konnten die Schoten zusätzlich an der Pflanze in der Feuchtkammer (s. o.) auf Resistenz getestet werden.

2.8 Morphologische Charakterisierung der Kreuzungs- und Rückkreuzungsnachkommen

Sämtliche Kreuzungs- und Rückkreuzungsnachkommen der verschiedenen Kreuzungsgruppen wurden hinsichtlich ihres allgemeinen Habitus mit dem Raps verglichen. Als Merkmale wurden hier vorrangig Wuchshöhe und -form, Blattgröße, -form und -farbe sowie Besonderheiten der Blütenstände (Blütenfarbe, Anzahl der Blüten, Deformationen der Blütenorgane, Abweichungen von der für Kreuzblütler charakteristischen Blütenformel) bewertet.

2.9 Bestimmung der Fertilität von Kreuzungs- und Rückkreuzungsnachkommen

Zur Bestimmung der Fertilität wurden zwei bis drei Klone des zu untersuchenden Genotyps mittels Knospenbestäubung geselbstet, so dass insgesamt mindestens zehn Blütenstände pro Genotyp bestäubt wurden. Anschließend wurden die im Folgenden aufgeführten Verhältnisse berechnet, wobei die Anzahl der Genotypen der Anzahl der aus jeweils einem Samen entstandenen Genotypen einschließlich der Anzahl generierter Kallusse entspricht:

- 1) Samenansatz nach Selbstung (durchschnittliche Anzahl gebildeter Samen pro Schote):

$$SA_{[\text{Selbstung}]} = \text{Anzahl Samen/Anzahl Schoten}$$

- 2) Samenansatz nach Kreuzung (durchschnittliche Anzahl gebildeter Samen pro bestäubter Knospe):

$$SA_{[\text{Kreuzung}]} = \text{Anzahl Samen/Anzahl bestäubter Knospen}$$

- 3) Kreuzungseffizienz nach Rückkreuzung (durchschnittliche Anzahl generierter Genotypen pro bestäubter Knospe in Prozent):

$$KE [\%] = \text{Anzahl Genotypen/Anzahl bestäubter Knospen} \times 100 \%$$

- 4) Selbstungseffizienz (durchschnittliche Anzahl generierter Selbstungsnachkommen pro Schote in Prozent):

$$SE [\%] = \text{Anzahl Genotypen/Anzahl Schoten} \times 100 \%$$

- 5) Keimungsrate in Prozent:

$$\text{Keimungsrate} [\%] = \text{Anzahl gekeimter Samen/Anzahl ausgelegter Samen} \times 100 \%$$

2.10 DNA-Isolierung

2.10.1 DNA-Isolierung mittels CTAB (modifiziert nach ROGERS & BENDICH 1985)

2.10.1.1 CTAB-Gesamt-DNA-Präparation

Zur Isolierung genomischer DNA aus Blattmaterial wurden ca. 4 g Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver gemörsert, in Polyallomerröhrchen gegeben und pro

1 g Pflanzenmaterial mit 2,5 ml auf 65 °C erwärmtem 2 x CTAB-Puffer (2 % CTAB, 1,4 M NaCl, 100 mM Tris/HCl, pH-Wert 8, 20 mM EDTA) und 100 µg RNaseA versetzt. Nach einer 20minütigen Inkubation bei 65 °C wurden die Proben auf RT abgekühlt, anschließend mit 1 Vol Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt und gründlich gemischt. Zur Trennung der Phasen wurde 10 min bei RT mit 5600 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 0,2 Vol 5 x CTAB-Puffer (5 % CTAB, 350 mM NaCl) 10 min bei 65 °C inkubiert und anschließend mit 1 Vol Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt. Es folgte eine Zentrifugation bei RT mit 5600 x g für 20 min. Die im Überstand gelösten Nukleinsäuren wurden mit mindestens 2 Vol Präzipitationspuffer (1 % CTAB, 50 mM Tris/HCl, pH-Wert 8, 10 mM EDTA) über Nacht bei RT gefällt. Nach der Präzipitation erfolgte eine 10minütige Zentrifugation bei RT mit 5600 x g. Die Nukleinsäuren im Pellet wurden 5-10 min bei 65 °C in 1-2 ml HS-TE Puffer (1 M NaCl, 1 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris/HCl, pH-Wert 8) gelöst und mit 2 Vol absolutem Ethanol 30 min bei -70 °C gefällt. Im Anschluss wurde 20 min bei 5600 x g und 4 °C zentrifugiert, das Pellet über Nacht im Kühlschrank in 100-200 µl *aqua bidest.* gelöst und die DNA anschließend bei -20 °C gelagert.

2.10.1.2 CTAB-Mini-Präparation

DNA für Mikrosatelliten-Analysen wurde mittels einer CTAB-Mini-Präparation isoliert: Ca. 0,2 g Blattmaterial wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäßen 2-3 Tage bei 50 °C luftgetrocknet und anschließend mit einer Edelstahlkugel (Ø 3 mm) 3 min bei 1800 Schwingungen pro Minute (30 Hz) in der Labor-Schwingmühle (Retsch, Haan, Deutschland) zu einem feinen Pulver gemahlen. Das Pulver wurde 10 min bei 65 °C mit 300 µl 2 x CTAB-Puffer (100 mM Tris pH-Wert 8; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA pH-Wert 8; 2 % CTAB; 1 % PVP) inkubiert und die DNA mittels eines gleichen Volumenanteils Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) bei 13000 rpm für 1-2 min extrahiert. Anschließend wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA durch Zugabe von mindestens 2 Vol absolutem Ethanol (30 min bei -20 °C) und anschließender 20minütiger Zentrifugation bei 16060 x g und 4 °C gefällt. Das Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, bei 37 °C luftgetrocknet und die DNA über Nacht bei 4 °C in 50 µl *aqua bidest.* gelöst.

2.10.2 DNA-Minipräparation (modifiziert nach EDWARDS *et al.* 1991)

Kleinere DNA-Mengen für RAPD-PCR-Analysen wurden mittels der folgenden Schnellmethode isoliert. Ca. 0,3 g Blattmaterial wurde von der Pflanze abgenommen und mit 400 µl Extraktionspuffer (200 mM Tris/HCl, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5 % SDS,

pH-Wert 7,5) versetzt. Die Probe wurde mit einem Teflon-Mikropistill (Eppendorf Micropistille Nr. 0030 120.973) bei ca. 1000 rpm homogenisiert und 10 min bei 16060 x g und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einem gleichen Volumen Isopropanol (-20 °C) 2 min bei RT und anschließend bei 4 °C und 16060 x g gefällt. Das Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen und luftgetrocknet und die DNA über Nacht in 100 µl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH-Wert 8) bei 4 °C gelöst.

2.11 Konzentrationsbestimmung von DNA-Proben

DNA-Konzentrationen wurden gelelektrophoretisch (0,8 % Agarose in 1 x TBE-Puffer mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid) im quantitativen Vergleich der Probe zu einer λ-DNA-Konzentrationsreihe (Roche, Mannheim, Deutschland) bestimmt.

2.12 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Bei allen PCR-Reaktionen diente ein PCR-Ansatz als Kontrolle (Wasserprobe), der keine DNA, sondern nur Reinstwasser (*aqua ad iniectabilia*), Primer, PCR-Puffer und *Taq*-Polymerase enthielt.

2.12.1 PCR mit Zufallsprimern (RAPD-PCR)

Die PCR wurde nach WILLIAMS *et al.* (1990) durchgeführt. Jeder Reaktionsansatz (25 µl) setzte sich aus 1 x PCR-Puffer (100 mM Tris-HCl; pH-Wert 8,8; 500mM KCl; 0,8 % Nonidet P4), 200 µM dNTPs, 40 ng DNA, 25 ng Primer, 3 mM Magnesiumacetat und 1 U *Taq*-Polymerase (MBI Fermentas) zusammen. Bei Verwendung des Thermocyclers der Firma Perkin Elmer wurde die Probe zusätzlich mit 35 µl Paraffinöl überschichtet.

Im Thermocycler wurde die DNA einmalig für 4 min bei 94 °C geschmolzen, und es schlossen sich 45 Zyklen an, in denen die Proben jeweils zunächst 20 sec bei 93 °C denaturiert wurden, die Primer sich 1 min bei 36 °C anlagerten und die DNA anschließend für 20 sec bei 72 °C synthetisiert wurde. Die Amplifikation wurde durch eine letzte, 6minütige Elongation bei 72 °C beendet.

RAPD-Primer

Zur zufälligen Amplifikation von DNA-Fragmenten wurden verschiedene RAPD-Primer der Firma Operon Technologies Inc., Alameda, USA und der Firma Roth, Karlsruhe eingesetzt. Die Primer hatten eine Länge von jeweils zehn Nukleotiden und bestanden zu 60-70 % aus

Guanin und Cytosin. Die *annealing*-Temperatur wurde für alle Primer auf 36 °C festgelegt. Die Bezeichnungen sowie die Sequenzen der verwendeten Primer sind in Tabelle 2.7 aufgeführt.

Tab. 2.7: Verwendete RAPD-Primer mit der jeweiligen Sequenz.

RAPD-Primer	Sequenz
OPA-08	5'> GTG ACG TAG G <3'
ROTH-E 05	5'> TCA GGG AGG T <3'
ROTH-E 07	5'> AGA TGC AGC C <3'
ROTH-E 11	5'> GAG TCT CAG G <3'
ROTH-F 03	5'> CCT GAT CAC C <3'
ROTH-F 08	5'> GGG ATA TCG G <3'
ROTH-F 11	5'> TTG GTA CCC C <3'
ROTH-F 12	5'> ACG GTA CCA G <3'
ROTH-F 18	5'> TTC CCG GGT T <3'
ROTH-F 19	5'> CCT CTA GAC C <3'
ROTH-H 04	5'> GGA AGT CGC C <3'
ROTH-H 09	5'> TGT AGC TGG G <3'
ROTH-H 10	5'> CCT ACG TCA G <3'
ROTH-H 11	5'> CTT CCG CAG T <3'
ROTH-H 12	5'> ACG CGC ATG T <3'
ROTH-I 03	5'> CAG AAG CCC A <3'
ROTH-I 07	5'> CAG CGA CAA G <3'
ROTH-I 11	5'> ACA TGC CGT G <3'
ROTH-I 18	5'> TGC CCA GCC T <3'

2.12.2 PCR mit spezifischen Primern, SSR (*simple sequence repeats*): „*touchdown*“-Protokoll

Zur Amplifikation von Mikrosatelliten wurde das SSR-Primerpaar HMR 997 eingesetzt (Aliquots wurden von dem Saaten-Union Resistenzlabor GmbH, Leopoldshöhe, zur Verfügung gestellt; Sequenzen der Primer wurden nicht bekannt gegeben).

Jeder PCR-Ansatz (10 µl) enthielt 200 µM dNTPs; 2,5 mM MgCl₂; 1 x PCR-Puffer (100 mM Tris-HCl; pH-Wert 8,8; 500mM KCl; 0,8 % Nonidet P4); 0,2 µM Primer A; 0,2 µM Primer B; 25 ng DNA und 0,5 U Taq Polymerase.

Im Thermocycler wurde die DNA 1 min bei 95 °C geschmolzen. Es schlossen sich zunächst 6 Zyklen mit 1 min Denaturierung bei 94 °C, 30 sec Annealing bei sukzessive 66-51 °C („*touch down*“) und 20 sec Elongation bei 72 °C an und anschließend 35 Zyklen mit 29 sec bei 94 °C, 30 sec bei 48 °C und 20 sec + 1 sec/pro Zyklus bei 72 °C. Die Reaktion wurde durch eine letzte Elongation bei 72 °C für 3 min und anschließender Abkühlung auf 4 °C beendet.

2.13 Gelelektrophorese

Die aufzutrennenden DNA-Proben wurden mit 6 x Ladepuffer (0,2 % Bromphenolblau, 0,2 % Xylencyanol FF, 60 % Glycerin, 60 mM EDTA) versetzt und auf das Gel geladen. Genomische DNA wurde in 0,8%igen Agarosegelen, RAPD-PCR-Produkte und SSR-PCR-Produkte wurden in 1,5 bzw. 3%igen Agarosegelen (NEEO-Agarose, Roth in 1 x TBE-Puffer) 12-16 h bei 1 V/cm in 20 x 25 cm-Elektrophoresekammern der Firma AGS GmbH, Heidelberg, aufgetrennt. Dem flüssigen Gel wurde Ethidiumbromid bis zu einer Endkonzentration von 0,5-0,7 µg/ml zugegeben, und die DNA nach der Gelelektrophorese unter dem UV-Transilluminator („Combi-Light“, Modell TFX) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 312$ nm sichtbar gemacht. Als Längenstandards dienten 100 bp DNA Ladder Plus, 1 kb DNA Ladder und λ DNA *EcoR* I + *Hind* III (MBI Fermentas). Alle verwendeten Längenstandards wurden in der Konzentration 0,5 mg/ml in 10 mM Tris/HCl, pH-Wert 7,6 und 1 mM EDTA geliefert, und jeweils 1 µg wurde auf das entsprechende Agarosegel geladen. Die Elektrophoresegele wurden mittels Geldokumentation (Cybertech CS-1 Image Documentation System, Video Copy Processor, Model P68E, Mitsubishi) digitalisiert und mit Hilfe des Programmes Adobe Photoshop 4.0 LE bearbeitet.

2.14 Cytologische Untersuchungen

2.14.1 Klassische Chromosomenpräparationen (Mitosepräparate)

Die Bestimmung von Chromosomenzahlen erfolgte an meristematischem Gewebe aus Wurzelspitzen bzw. Griffeln.

2.14.1.1 Wurzelspitzenpräparate

Von jungen Pflanzen aus gut durchwurzelt Tontöpfen (Ø 5 cm) wurden ca. 3-4 Wochen nach dem Pikieren bzw. nach Überführen aus *in vitro*-Kultur in Erde früh morgens möglichst weiße, ca. 1 cm lange Wurzelspitzen abgenommen und zur Anreicherung von

Metaphasen in 2-3 ml 2 mM 8-Hydroxychinolin eingelegt. Nach einer 2,5-3stündigen Inkubation bei RT wurden die Wurzelspitzen kurz mit einem Zellstofftuch getrocknet und in Fixierungslösung [Ethanol (96 %)-Eisessig, 3:1] überführt. Bis zu seiner Verwendung wurde das Material in dieser Lösung bei 4 °C oder, bei längerer Lagerung, bei -20 °C aufbewahrt.

2.14.1.2 Griffelpräparate

Für cytologische Untersuchungen an Griffeln wurden aus ca. 5 mm langen Knospen die Griffel mit einer Pinzette herauspräpariert und bei RT für mindestens 4 h in 2 mM 8-Hydroxychinolin inkubiert. Anschließend wurden die Griffel in Ethanol (96 %)-Eisessig (3:1) fixiert und bei 4° C gelagert.

2.14.1.3 Färben von Wurzelspitzen- und Griffelchromosomen

Die fixierten Wurzelspitzen bzw. Griffel wurden über Nacht in 2 % Orcein-HCl [2 % (w/v) Orcein, 45 % (v/v) Essigsäure, 80 mM HCl, filtriert] gefärbt. Die intensiv gefärbten, meristematischen Bereiche der Wurzelspitzen wurden mittels einer Lanzettadel abgetrennt, auf einem Objektträger mit Karmin-Essigsäure [0,5 % (w/v) Karmin in 45 % (v/v) Essigsäure] überschichtet und über einer Flamme leicht erhitzt. Anschließend wurde das Präparat mit einem Deckglas zunächst mit einem kräftigen Daumendruck und dann durch vorsichtiges Klopfen mit einer Präpariernadel gespreitet. Die gefärbten Griffel wurden vollständig auf einen Objektträger transferiert und ansonsten genauso wie die Wurzelspitzen behandelt.

Die mikroskopische Analyse erfolgte mit Hilfe des Laborlux 12 Mikroskops (Leitz, Wetzlar) bei 1250facher Vergrößerung.

Für Mikrophotographien stand das Photomikroskop III Stativ (Zeiss, Oberkochen) unter Verwendung eines Schwarz-Weiß-Filmes (AGFAORTHO 25 Professional, Agfa, Leverkusen) zur Verfügung. Digitale Schwarz-Weiß-Fotografien wurden am Mikroskop DMRX (Leitz, Wetzlar) mit Hilfe einer digitalen Kamera (Pro Series High Performance CCD Camera, Media Cybernetics, über Chromaphor, Duisburg) und der Bildbearbeitungssoftware „Image-Pro® Plus“ (Version 4.5, Media Cybernetics, über Chromaphor, Duisburg) angefertigt.

Ein Ergebnis wurde als valide gewertet, wenn von jeder zu untersuchenden Pflanze die Chromosomenzahlen von mindestens fünf Zellen eindeutig bestimmt werden konnten.

2.15 Genomische *in situ*-Hybridisierung (GISH)

Die Genomzusammensetzungen ausgewählter Kreuzungs- und Rückkreuzungsnachkommen wurden mittels genomischer *in situ*-Hybridisierung nach SNOWDON *et al.* (1997) untersucht.

2.15.1 Herstellen von Droplet-Präparaten

Die wie in Abschnitt 2.14.1.1 beschriebenen fixierten Wurzelspitzen wurden kurz in *aqua bidest.* gewaschen und 15 min in Enzympuffer (40 mM Citronensäure, 60 mM Tri-Natriumcitrat, pH-Wert 4,6) äquilibriert. Die 1-2 mm langen Meristeme von 10-20 Wurzelspitzen wurden anschließend abgetrennt und in 50 µl Enzymlösung [2 % (w/v) Cellulase (Calbiochem), 20 % (v/v) Pectinase (aus *Aspergillus niger*, Sigma) gelöst in Enzympuffer, sterilfiltriert] für 90-120 min bei 37 °C inkubiert. Die Enzymlösung wurde durch viermaliges Waschen in je 250 µl Enzympuffer entfernt. Letzterer wurde anschließend durch 250 µl 60 %ige Essigsäure ersetzt, die ebenfalls viermal erneuert wurde. Nach der letzten Erneuerung der Essigsäure wurde der Ansatz für etwa 10-15 min bei RT stehen gelassen, um ein klares Cytoplasma zu erhalten. Die Essigsäure wurde anschließend durch 100 µl Fixativ [Ethanol (96 %)-Eisessig, 3:1] ersetzt und für mindestens 15 min bei -20 °C inkubiert.

Die Zellverbände wurden durch mehrmaliges Aufziehen mit einer engen Pipettenspitze aufgebrochen, und je 10 µl dieser kalten Lösung (-20°C) wurden auf kalte (-20°C) zuvor gereinigte (Waschen in der Spülmaschine, Spülen in *aqua bidest.* und Abwischen mit 96 % Ethanol) Superfrost-Objekträger (Roth) aus 20-30 cm Fallhöhe pipettiert. Um die Chromosomen anschwellen zu lassen, wurden die Präparate mehrmals angehaucht, anschließend bei RT getrocknet und bei -20°C gelagert.

2.15.2 Herstellung genomischer DNA-Sonden

Die DNA (der jeweiligen Donorart) wurde entweder mittels Nick Translation (nach RIGBY *et al.* 1977) oder mittels „*Random Primed Oligolabelling*“ (nach FEINBERG-VOGELSTEIN 1983, 1984) mit Digoxigenin (DIG) markiert.

Die **Nick-Translation** wurde unter Verwendung des „DIG-Nick Translation Mix“ (Roche, Mannheim) gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Hierbei wurde das Digoxigenin enzymatisch in Form des modifizierten Nukleotids in die genomische DNA eingebaut, und es wurden Sonden mit Fragmentgrößen zwischen 200-500 bp synthetisiert.

Pro Markierungsansatz wurde 1 µg der zu markierenden DNA in 16 µl sterilem *aqua bidest.* aufgenommen, mit 4 µl „DIG-Nick Translation Mix“ mit 50 % (v/v) Glycerin (DNA-

Polymerase I, DNase I, 0,25 mM dATP, 0,25 mM dCTP, 0,25 mM dGTP, 0,17 mM dTTP und 0,08 mM DIG-11-dUTP) versetzt und für 90 min bei 15°C im Wasserbad inkubiert.

Abschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA (pH-Wert 8) und 10minütiges Erhitzen auf 65 °C gestoppt.

Alternativ zur Nick Translation wurde das modifizierte Nukleotid Digoxigenin-11-dUTP mittels „**Random Primed Oligolabelling Kit**“ (Roche, Mannheim) gemäß den Herstellerangaben in die DNA eingebaut. Hierfür wurden 0,2 µg genomischer DNA durch 10minütiges Erhitzen auf 100 °C und anschließendes Abkühlen auf Eis denaturiert. Auf Eis wurden anschließend zu einem Endvolumen von 20 µl je 1 µl dATP, dCTP und dGTP (jeweils 0,5 mM in Tris-Puffer), 1,6 µl einer 1:1-Mischung aus dTTP (0,5 mM in Tris-Puffer) und 0,3 mM Digoxigenin-11-dUTP, 2 µl Reaktionsgemisch (Hexanukleotidgemisch in 10 x Reaktionspuffer), steriles *aqua bidest.* und 2 U Klenow-Enzym gemischt und 60 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 µl 0,2 M EDTA (pH-Wert 8,0) und 10minütiges Erhitzen auf 65 °C gestoppt.

2.15.3 Bestimmung der Markierungseffizienz

Die Bestimmung der Markierungseffizienz erfolgte mittels „DIG *Quantification*“ und „DIG *Control Teststrips*“ gemäß Herstellerangaben (Roche, Mannheim).

Die DIG-markierten DNA-Proben wurden mit DNA-Verdünnungspuffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH-Wert 8 + 50 µg/ml sonifizierte Lachs-DNA) auf fünf definierte Verdünnungen gebracht (1:3,3; 1:10; 1:33; 1:100; 1:333). Eine Membran (*Quantification Teststrip*) wurde mit je 1 µl pro Verdünnungsstufe beladen und luftgetrocknet. Als Kontrolle diente der *Control Teststrip*, beladen mit 300, 100, 30, 10 und 3 pg ebenfalls DIG-markierter Kontroll-DNA. Die markierte DNA beider Teststreifen wurde immunologisch/enzymatisch mit Anti-Digoxigenin-AP (Fab-Fragmente mit aus Schaf isolierten anti-DIG Antikörpern, gebunden an Alkaline Phosphatase) und den Farbsubstraten NBT/BCIP[®] detektiert. Hierfür wurden die Teststreifen wie folgt behandelt: Zunächst wurden unspezifische Bindungsstellen 2 min in Blockierungslösung (1:10 Verdünnung des 10 x Blockingreagenz mit Maleinsäurepuffer) abgesättigt. Die Antikörperbindung erfolgte 3 min in Antikörperlösung (Anti-Digoxigenin-AP 1:2000 Verdünnung auf 375 mU/ml mit Blockierungslösung), anschließend wurde 1 min in Blockierungslösung inkubiert. Unspezifisch gebundene Antikörper wurden durch Waschpuffer (0,1 M Maleinsäure; 0,15 M NaCl; pH-Wert 7,5; 0,3 % v/v Tween 20[®]) entfernt (1 min). Anschließend wurden die Teststrips 2 min in Detektionspuffer (0,1 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, pH-Wert 9,5) äquilibriert. Die Farbreaktion fand für 10-15 min in Farbsubstratlösung (40 µl NBT/BCIP[®] in 2 ml Detektionspuffer) unter Lichtausschluss statt und wurde durch Abwaschen unter fließendem Leitungswasser gestoppt. Die Menge an

DIG-markierter DNA auf dem *Quantification Teststrip* wurde anschließend durch optischen Vergleich mit den Signalintensitäten auf dem *Control Teststrip* abgeschätzt und der Anteil an markierter DNA im Gesamtansatz errechnet.

2.15.4 Fertigstellen der DNA-Sonden

Wenn der Anteil an markierter DNA im Gesamtansatz ca. 0,5-1 ng/µl entsprach, wurde die Sonde fertig gestellt, indem homologe Sequenzen beider Kreuzungspartner durch Zugabe eines 50fachen Überschusses an *blocking*-DNA (Raps-DNA, durch Autoklavieren auf 100-200 bp Fragmentgröße gebracht), bezogen auf die Menge der für die Markierung eingesetzten DNA, und LiCl bis zu einer Endkonzentration von 0,3 M abgesättigt wurden. Anschließend wurde die DNA mit mindestens 2,5 Vol absolutem Ethanol (-20 °C) gefällt (60 min bei -70 °C und 30minütige Zentrifugation bei 4 °C und 16060 x g), in 100 µl Formamid resuspendiert (30-60 min bei 37 °C) und der Ansatz mit 1 Vol 2 x Hybridisierungsmastermix (4 x SSC, 20 % w/v Dextransulfat) aufgefüllt.

2.15.5 Denaturierung der Chromosomen

Die Präparate wurden zunächst in drei aufeinander folgenden Schritten auf dem Schüttler für die Hybridisierung vorbereitet [5 min in 1 x PBS; 10 min in 1 x PBS, 50 mM MgCl₂, 1 % (v/v) einer technischen Lösung Formaldehyd (37 %); 5 min in 1 x PBS]. Anschließend wurden die Präparate mittels einer Ethanol-Reihe dehydriert (jeweils 2 min in 70 %, 90 %, 95 % Ethanol auf Eis) und mindestens 15 min bei RT getrocknet.

Zur Denaturierung der Chromosomen wurden die Präparate mit je 180 µl Denaturierungslösung (2 x SSC, 70 % Formamid, 70 °C) überschichtet, mit einem Deckglas (Roth, 24 x 60 mm) als Verdunstungsschutz abgedeckt und für 2 min (auf einer Metallplatte im Wasserbad) auf 70 °C erhitzt. Die Präparate wurden anschließend erneut mittels einer Ethanol-Reihe dehydriert und getrocknet.

2.15.6 Hybridisierung und Waschschr

Die Sonde wurde 12 min bei 75 °C denaturiert, dann für 20 sec auf Eis abgekühlt und anschließend 20 min bei 37°C prähybridisiert. Anschließend wurden die Präparate mit jeweils 17 µl der Sonde überschichtet, mit einem Deckglas (Roth, 24 x 32 mm) abgedeckt und mit Fixogum (Rubber Cement, Marabu) abgedichtet. Die Hybridisierung der Sonden auf den Chromosomen erfolgte über Nacht bei 37 °C und 100 % Luftfeuchtigkeit.

Unspezifisch gebundene DNA wurde im Anschluss durch drei aufeinander folgende Waschstufen bei 42 °C entfernt (5 min in 2 x SSC, 10 min in 0,2 x SSC, 5 min in 2 x SSC). Die Objektträger wurden bis zum Beginn der Detektion (mindestens 3 min) in 4 x SSC/0,5 % (v/v) Tween 20[®] bei RT stehen gelassen.

2.15.7 Detektion

Die Sonde wurde mit einem gegen DIG gerichteten, FITC-markierten Antikörper und einer anschließenden Antikörperkaskade zur Amplifikation des Signals detektiert.

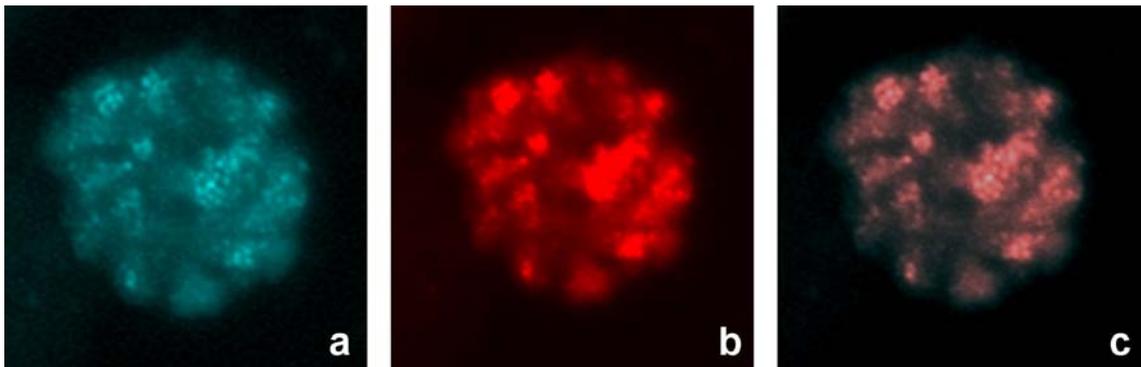
Zunächst wurde 1 µg (gelöst in 50 µl) des primären Antikörpers [Sheep Anti-Digoxigenin-Fluorescein Fab Fragments (Roche)] für 15 min bei 37 °C und 100%iger Luftfeuchtigkeit an die Sonde gebunden. Nichtgebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen (jeweils 2 min unter Schütteln) in 4 x SSC/0,5 % Tween 20[®] entfernt. Im Anschluss wurden 5,35 µg (ebenfalls gelöst in 50 µl) des sekundären Antikörpers [Rabbit Anti-Sheep IgG, FITC Conjugate (Sigma)] und 0,25 µg (in 50 µl) des tertiären Antikörpers [Goat Anti-Rabbit IgG Fluorescein Fab Fragments (Chemicon)] respektive an den primären und sekundären Antikörper wie oben beschrieben gebunden. Nach dem letzten Waschen wurden 100 µl DAPI (2 µg/ml) auf die Präparate gegeben, 2-3 min einwirken gelassen und mit Leitungswasser abgespült. Die Fluoreszenz wurde durch Zugabe von 30 µl DABCO (10 % Phosphatpuffer, 90 % Glycerin, 100 mg/ml DABCO) stabilisiert. Die Präparate wurden mit Deckgläsern (Roth, 24 x 32 mm) abgedeckt, über Nacht ruhen gelassen und anschließend bei 500 und 1000facher Vergrößerung mittels eines Fluoreszenzmikroskops (DMRX, Leitz, Wetzlar) analysiert. Mit Hilfe verschiedener Filter wurden zum einen die Chromosomen (DAPI-Filter) und zum anderen die Fluoreszenzsignale der an die Sonde gebundenen Antikörper (FITC-Filter) sichtbar gemacht und mit Hilfe einer Kamera (Pro Series High Performance CCD Camera, Media Cybernetics, über Chromaphor, Duisburg) digitalisiert. Das „Einfärben“ (DAPI-Signale in blau, FITC-Signale in rot) und Übereinanderlegen (*overlay*) beider Bilder erfolgte mit der Bildbearbeitungssoftware „Image Pro[®] Plus“ (Version 4.5, Media Cybernetics, über Chromaphor, Duisburg).

2.15.8 Kontrollen

Aufgrund des teilweise hohen Homologiegrades (insbesondere bei der *D. erucoidea*-*B. napus*-Kreuzungsgruppe) dienen die in Tabelle 2.8 aufgeführten Ansätze jeweils als Kontrollen. Ergebnisse wurden als valide gewertet, wenn bei den Kontrollen 1 und 2 keine Signale detektiert wurden und bei Kontrolle 3 alle Chromosomen der Donorart fluoreszierten (Abb. 2.6).

Tab. 2.8: Durchgeführte Kontrollen für die genomische *in situ*-Hybridisierung.

	Kontrolle 1	Kontrolle 2	Kontrolle 3
Denaturierte Chromosomen auf Objektträger	Raps	Raps	Donor
Sonde	Donor-DNA Absättigung mit Raps-DNA	-	Donor-DNA Absättigung mit Raps-DNA
Antikörperkaskade	+	+	+
Erwartete Fluoreszenzsignale	keine	Keine	Alle Chromosomen

**Abb. 2.6:** Beispiel für eine Kontrolle 3 bei *D. eruroides* als Resistenzdonor (a: mikroskopische Aufnahme mit DAPI- und b: mit FITC-Filter; c: *overlay* der beiden Bilder).