

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Untersuchungsmaterial

2.1.1 Pflanzenmaterial

2.1.1.1 Allgemeines

In Tabelle 2.1 sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Arten der Familie *Brassicaceae* und eine Reihe kommerzieller Rapssorten aufgeführt. Diese dienten in erster Linie als Referenzgenotypen, waren jedoch auch teilweise Eltern der Originalkreuzungen (siehe Kap. 2.1.1.2 bis 2.1.1.4; PLÜMPER 1995, SACRISTÁN & GERDEMANN 1986).

Tab. 2.1 Referenzgenotypen. Bei drei Linien wurde die Chromosomenzahl noch nicht (*) bzw. anhand ausgewählter Individuen erst im Verlauf der Untersuchungen (**) bestätigt.

Genotyp	Chromosomenzahl (2n)	Herkunft	Sortimentsnummer (sofern vorhanden)
<i>Brassica carinata</i> A. Br. (= „ <i>B. carinata</i> Gat. I“)	34	Gatersleben	BRA 1031/79
<i>Brassica carinata</i> A. Br. (= „ <i>B. carinata</i> Gat. II“)	34	Gatersleben	BRA 1043/89
<i>Brassica carinata</i> A. Br. (= „ <i>B. carinata</i> Gött.“)	34	Göttingen a	BBCC 3219
<i>Brassica cretica</i> Lam. ssp. <i>cretica</i>	18	Kreta	
<i>Brassica juncea</i> (L.) Czern.	36	IAG	29
<i>Brassica napus</i> L. cv. „Loras“	38	IAG	
<i>Brassica napus</i> L. cv. „Ceres“	38	NPZ	
<i>Brassica napus</i> L. cv. „Madora“	38	NPZ	
<i>Brassica napus</i> L. cv. „Liropa“	38	DSV	Linie WRG 20
<i>Brassica napus</i> L. cv. „Jet Neuf“	38	IAG	
<i>Brassica napus</i> L. cv. „Lesira“	38	IAG	
<i>Brassica napus</i> L. cv. „Lirabon“	38	Göttingen b	
<i>Brassica napus</i> L. cv. „Glacier“	38	Göttingen b	
<i>Brassica napus</i> L. cv. „Quinta“	38	Göttingen b	
<i>Brassica napus</i> L. Linie PF 1857/95 (= „NPZ I“)	(38)*	NPZ	
<i>Brassica napus</i> L. Linie PF 99127/99 (= „NPZ II“)	(38)*	NPZ	
<i>Brassica nigra</i> (L.) Koch	16	Göttingen a	Linie 460
<i>Coincya monensis</i> (L.) Greuter & Burdet ssp. <i>recurvata</i>	24	Gatersleben	SIN R 35/86
<i>Coincya monensis</i> (L.) Greuter & Burdet ssp. <i>recurvata</i> (= <i>C. monensis</i> „86“)	24	Gatersleben	SIN R 35/86 (CR 2052/86)
<i>Coincya monensis</i> (L.) Greuter & Burdet ssp. <i>recurvata</i> (= <i>C. monensis</i> „95“)	24	Gatersleben	SIN R 35/95 (CR 2052/95)
<i>Ricotia cretica</i> Boiss. & Heldr.	?	Kreta	
<i>Sinapis arvensis</i> L.	18	Braunschweig	22529
<i>Sinapis arvensis</i> L. var. <i>orientalis</i>	18	Gatersleben	SIN 17/79
<i>Brassica napus</i> - <i>Brassica juncea</i> -Linie (= 98 MDB self 23)	(38)**	INRA	98 MDB self 23

Mit Ausnahme von *Ricotia cretica* (Tribus *Lunarieae*) gehören alle hier erwähnten Taxa zur Tribus *Brassicaceae* (JANCHEN 1942). Die Cruciferen-typische Vielzahl von Synonymen, auch der hier relevanten Arten, ist bei WARWICK *et al.* (2000) zusammengestellt (für eine Auswahl siehe Kap. 1.3). Dort wird auch die Problematik der Abgrenzung einer Subtribus *Brassicinae* diskutiert. Über die Herkunft des jeweiligen Saatguts (Institutssortimente, Genbank Gatersleben, Exkursionsmaterial, kommerzielle Zuchtbetriebe) gibt Tabelle 2.2 detaillierter Auskunft. Um eine weitgehende genetische Konstanz der Referenzgenotypen zu sichern, kam in der Regel direkt erhaltenes Saatgut zum Einsatz. In Ausnahmefällen (*B. juncea*, *B. napus* cvs. „Loras“, „Liropa“, „Jet Neuf“ und „Lesira“) wurde auch eigener Nachbau verwendet.

Weitere Referenzgenotypen entstanden mit dem Fortschreiten der jeweiligen Rückkreuzungsprogramme. Auf diese wird in den Abschnitten 2.1.1.2 bis 2.1.1.4 eingegangen.

Tab. 2.2 Verzeichnis der Herkünfte des Pflanzenmaterials.

Abkürzung (siehe Herkunft in Tab. 2.1)	Herkunft
Braunschweig	Biologische Bundesanstalt Braunschweig, Genbank
DSV	Deutsche Saatveredelung Lippstadt-Bremen GmbH zu Lippstadt
Gatersleben	Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung Gatersleben, Genbank
Göttingen a	Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, Universität Göttingen
Göttingen b	Institut für Pflanzenpathologie und Pflanzenschutz, Universität Göttingen
IAG	Institut für Biologie - Angewandte Genetik, Freie Universität Berlin
INRA	Institut National de la Recherche Agronomique, Le Rheu/Frankreich
Kreta	Eigensammlung bei Praktikum „Biogeografie von Kreta“ (Lehrveranstalter Priv.-Doz. Dr. H. Kürschner/Prof. Dr. H. H. Hilger), Imvros-Schlucht, 18.05.1999, Kreta/Griechenland
NPZ	Norddeutsche Pflanzenzucht, Hans Georg Lembke KG, Hohenlieth, Malchow/Poel

2.1.1.2 *Brassica napus*-*Coincya monensis*-Linien

Die Herkunft des Pflanzenmaterials dieser Gruppe ist in Abbildung 2.1 dargestellt und geht auf PLÜMPER (1995) zurück (siehe auch WINTER *et al.* 1999 und 2003a & b). Am Anfang stand eine Kreuzung zwischen der Sommerrapssorte „Loras“ und *Coincya monensis* ssp. *recurvata* (Schnabelsenf, Sortimentsnummer SIN R 35/86). Die für das weitere Rückkreuzungsprogramm verwendete F₁ zeichnete sich durch eine spontane Chromosomenverdopplung aus. Von den daraus mittels Ovuli- bzw. Ovarienkultur erstellten 18 BC₁-Pflanzen (mit Chromosomenzahlen von 2n=46-76, nicht mehr auf bestimmte Einzelpflanzen beziehbar) zeigten zehn Genotypen eine Adultresistenz gegenüber *Leptosphaeria maculans*. Sofern eine genaue Zuordnung zu einer der beiden, oft parallel angewandten Methoden (siehe PLÜMPER 1995) im nachhinein nicht mehr möglich ist bzw. irrelevant erscheint, wird zukünftig lediglich von *embryo rescue* gesprochen. Die erwähnten zehn Individuen wurden erneut mit *B. napus* „Loras“ zurückgekreuzt. Unter den daraus ohne *embryo rescue* entstandenen BC₂-Nachkommen zeigte die Pflanze 16/1 das höchste Resistenzniveau gegenüber dem Pilzpathogen (B. PLÜMPER/IAG, pers. Mitteilung).

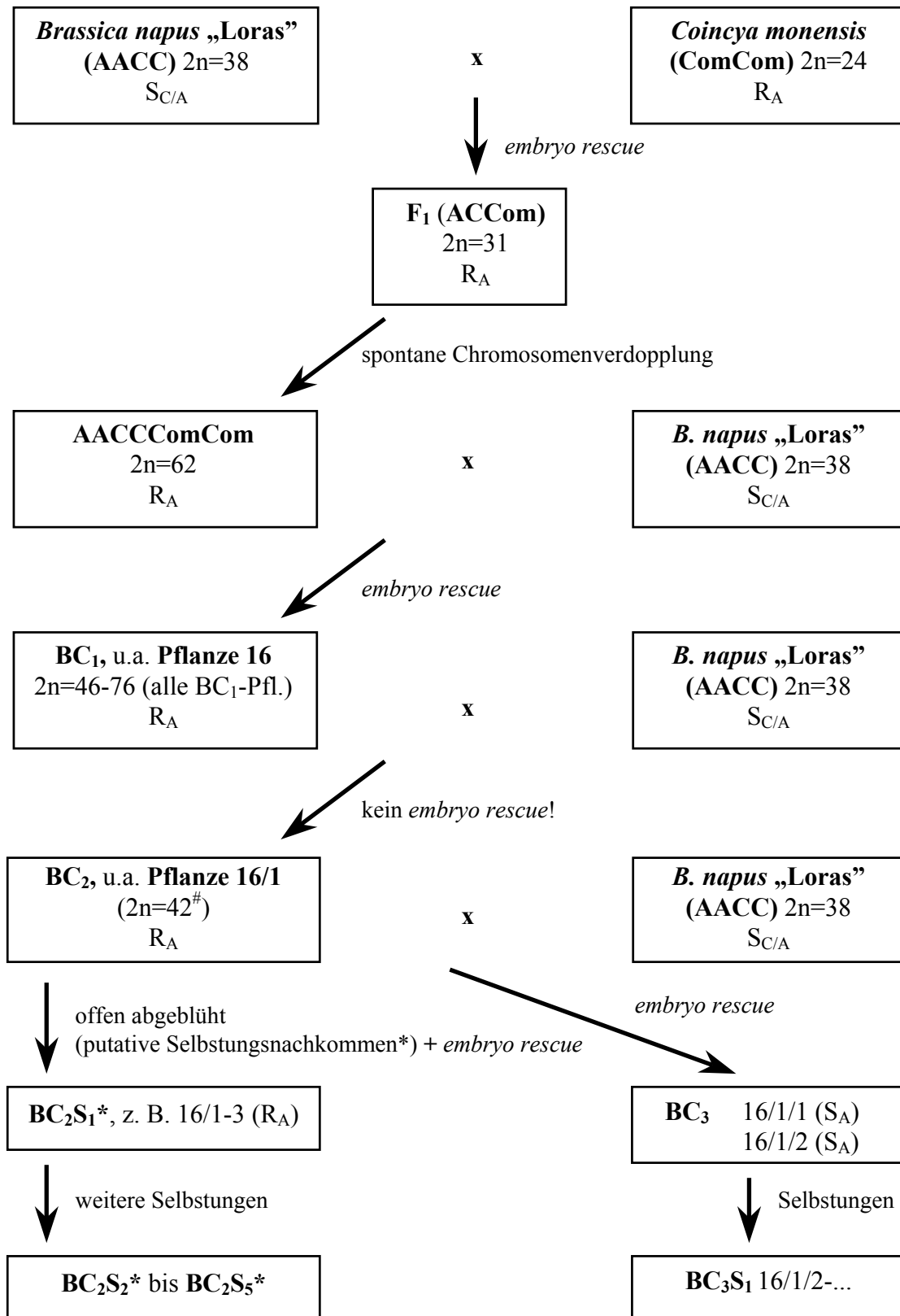


Abb. 2.1 Herkunft der *B. napus*-*C. monensis*-Linien und Rückkreuzungsprogramm. Genombezeichnungen: A, C und Com. BC_x = x-te Rückkreuzungsgeneration, S_x = x-te Selbstungsgeneration. Resistenzklassen: R = resistent, S = anfällig, C = Kotyledonen- (in Zus.), A = Adult- (in Zus.), C/A = kombinierte Kotyledonen- und Adultresistenz bzw. -anfälligkeit. Weitere Erklärungen im Text und bei PLÜMPER (1995). [#] = B. PLÜMPER/IAG, pers. Mitteilung.

Diese hochgradig sterile BC₂ 16/1 bildete den Ausgangspunkt der nachfolgenden für diese Arbeit relevanten Untersuchungen. Im Rahmen parallel dazu am Institut verlaufender Studien wurde versucht, weitere Rückkreuzungsgenerationen zu erstellen. Trotz erheblichen Aufwandes (Kap. 3.1.2.1) gelang es lediglich, zwei adultanfällige BC₃-Individuen zu generieren (S. GÄRTIG/IAG, pers. Mitteilung; WINTER *et al.* 1999, 2003a & b). Diese und die Selbstungsnachkommenschaft der BC₃-Pflanze 16/1/2 wurden nur zu Vergleichszwecken noch näher untersucht.

Das Hauptaugenmerk der Promotion lag auf einigen putativen BC₂S₁-Pflanzen, die im Laufe der Parallelstudien mittels *embryo rescue* erzeugt wurden und auf das offene Abblühen der BC₂-Pflanze 16/1 zurückgehen (S. GÄRTIG, pers. Mitteilung; im folgenden als BC₂S₁*-Genotypen bezeichnet), und auf der Analyse ihrer Selbstungsnachkommenschaften (BC₂S₂* bis BC₂S₅*). Hierbei konzentrierten sich die Untersuchungen auf die Nachkommenschaften der BC₂S₁* 16/1-3.

2.1.1.3 *Brassica napus-Sinapis arvensis*-Linien

Auch in dieser Gruppe führte PLÜMPER (1995) die Originalkreuzungen durch. Darüber hinaus erstellte er die ersten drei Rückkreuzungsgenerationen (siehe auch SNOWDON *et al.* 2000).

Die Nachkommenschaften basieren auf der Kreuzung *B. napus* „Madora“ (Winterraps) x *Sinapis arvensis* (Ackersenf, Sortimentsnummer 22529). Die F₁ zeigte wie bei den *B. napus-C. monensis*-Linien eine spontane Chromosomenverdopplung. Die Winterrapsorte „Ceres“ diente als männlicher Rückkreuzungselter. *Embryo rescue*-Methoden waren nur bis zur BC₂ notwendig.

Abbildung 2.2 zeigt die Herkunft des Untersuchungsmaterials. Zu Beginn der hier beschriebenen Arbeiten existierten hinsichtlich ihres Resistenzverhaltens und ihrer Chromosomenzahl grob charakterisierte Pflanzen der BC₃-Generation (WINTER *et al.* 1999, SNOWDON *et al.* 2000). Weitere Rückkreuzungen und Selbstungen erfolgten, so daß in die hier dargelegten Analysen neben BC₃-Genotypen Individuen folgender Generationen einbezogen werden konnten: BC₃S₁, BC₃S₂, BC₃S₃, BC₄, BC₄S₁ und BC₄S₂.

2.1.1.4 *Brassica napus-Brassica juncea*-Linien

Das untersuchte Material geht auf ein Rückkreuzungsprogramm zurück, mit dem bereits vor nahezu 20 Jahren am Institut für Angewandte Genetik (heute: Institut für Biologie - Angewandte Genetik) begonnen wurde (SACRISTÁN & GERDEMANN 1986, WINTER & SACRISTÁN 1998). Der Weg von der Originalkreuzung bis zu mittels Mikrosporenkultur erzeugten dihaploiden (DH-) Pflanzen, dem Basismaterial der hier darzulegenden Untersuchungen, ist schematisch in Abbildung 2.3 dargestellt.

Den Ausgangspunkt bildete eine Kreuzung zwischen *Brassica napus* cv. „Liropa“ (Linie WRG 20, Herkunft: Deutsche Saatveredelung Lippstadt-Bremen GmbH zu Lippstadt) und *Brassica juncea* (Sortiment Nr. 29, Sammlung des Instituts für Biologie - Angewandte Genetik - der FU Berlin). Es wurden Selbstungsnachkommen (S) von Pflanzen der zweiten (BC₂) und dritten (BC₃) Rückkreuzung mit *B. napus* „Liropa“ als rekurrentem Rückkreuzungspartner erzeugt, die nach Inokulation mit dem Pilz in Gewächshaustests z. T. resistent reagierten. Um homozygote dihaploide Linien zu gewinnen, wurde daraufhin zunächst haploides Material mit Hilfe der Mikrosporenkultur aus BC₂S₁- und BC₃S₁-Donorpflanzen hergestellt (M.D. SACRISTÁN/IAG,

pers. Mitteilung). Abbildung 2.3 verdeutlicht am Beispiel der Linie 4/21/7-9 den weiteren Verlauf der Vorarbeiten. Die Linie 4/21/7-9 geht auf eine Mikrospore (die „neunte“ in willkürlicher, fortlaufender Numerierung) der Donorpflanze 4/21/7 zurück, die wiederum auf der Selbstung einer Pflanze aus der zweiten Rückkreuzung (BC_2S_1 4/21) beruht. Alle in der vorliegenden Untersuchung verwendeten Linien sind auf spontane Diploidisierung (Indikator: Samenansatz) dieser haploiden Pflanzen zurückzuführen. Aus der Selbstungsnachkommenschaft dieser nunmehr als dihaploid bezeichneten Pflanzen wurden jeweils zehn Individuen ausgewählt, an denen Hypokotyl-Vortests im Gewächshaus durchgeführt wurden. Pflanzen, die ein besonders hohes Resistenzniveau zeigten, wurden ebenso ausgewählt wie solche, die sich als sehr anfällig erwiesen. Letztere dienten zu Vergleichszwecken. Derartig selektierte Genotypen wurden geselbstet. Die so entstandenen Nachkommenschaften von 17 DH-Pflanzen wurden hauptsächlich hinsichtlich ihrer Chromosomenzahl, ihres Resistenzverhaltens, ihrer Isoenzym-Bandenmuster und ihres Blühverhaltens untersucht (WINTER & SACRISTÁN 1998). Am Ende dieser Voruntersuchungen konnten unter denjenigen DH-Pflanzen, deren Selbstungsnachkommen ausschließlich eine Chromosomenzahl von $2n=38$ aufwiesen, die Genotypen $BC_3S_1DHS_1$ 7/10 und $BC_3S_1DHS_2$ 8/10 mit vergleichsweise hoher Adultresistenz (begründeten die putativen *B. napus*-*B. juncea*-Rekombinationslinien 7/10 und 8/10) identifiziert werden, während die Linie 4/9 (Selbstungsnachkommen der $BC_2S_1DHS_1$ -Pflanze 4/9) besonders anfällig war.

Selbstungsnachkommenschaften dieser Linien und der $BC_3S_1DHS_2$ -Pflanze 8/1, mit ebenfalls guter Adultresistenz, aber heterogener Chromosomenzahl (WINTER & SACRISTÁN 1998), dienten als Ausgangsmaterial der im Rahmen dieser Doktorarbeit erfolgten Untersuchungen. Die Linie 8/1 leitet sich von der gleichen Mikrospore wie die Linie 8/10 ab. „DH“ gibt hierbei den Zeitpunkt der Dihaploidisierung in der Generationenabfolge an.

Aufbauend darauf wurden zur Charakterisierung der (im Vergleich zur Resistenzausprägung der Linien mit *C. monensis* bzw. *S. arvensis* als Resistenzdonor eher moderaten) Adultresistenz aus den Ergebnissen von Resistenztests und mittels anschließender Selbstungen Pflanzen selektiert, die dihaploide Sublinien begründeten. Die resistenten Pflanzen $BC_3S_1DHS_2$ 7/10-6, $BC_3S_1DHS_3$ 8/1-7 und $BC_3S_1DHS_3$ 8/10-28 wurden ebenso näher betrachtet wie der anfällige Genotyp $BC_2S_1DHS_3$ 4/9-1-32. Die resistenten Pflanzen wurden jeweils mit dem anfälligen Vertreter reziprok gekreuzt. Die sechs F_1 -Populationen, daraus erstellte F_2 -Nachkommenschaften sowie Selbstungsnachkommen der Kreuzungseltern wurden in die weiteren Untersuchungen einbezogen. Dies gilt auch für BC_1 -Nachkommen, die aufgrund der Rückkreuzung mit der Sommerrapsorte „Loras“ bereits ohne Vernalisation blühten und auf interessante F_1 -Genotypen zurückgehen. Zur Analyse der Vererbung der Resistenz gegenüber dem australischen Isolat M1 wurden auch BC_1 -Generationen aus Rückkreuzungen von F_1 -Pflanzen mit *B. juncea* erstellt.

Zu Vergleichszwecken wurde eine von französischen Kooperationspartner zur Verfügung gestellte *B. napus*-*B. juncea*-Rekombinationslinie (98 MDB self 23) in einige Untersuchungen miteinbezogen. Bei dieser Linie, die sich ebenfalls von den in Abbildung 2.3 dargestellten Berliner Originalkreuzungen und frühen Rückkreuzungsgenerationen ableitet, wurde eine homozygot fixierte Kotyledonenresistenz gegenüber *L. maculans*-Isolaten der Pathogenitätsgruppen 3 und 4 beschrieben (A.M. CHÈVRE/INRA, Le Rheu; pers. Mitteilung; Kap. 1.3).

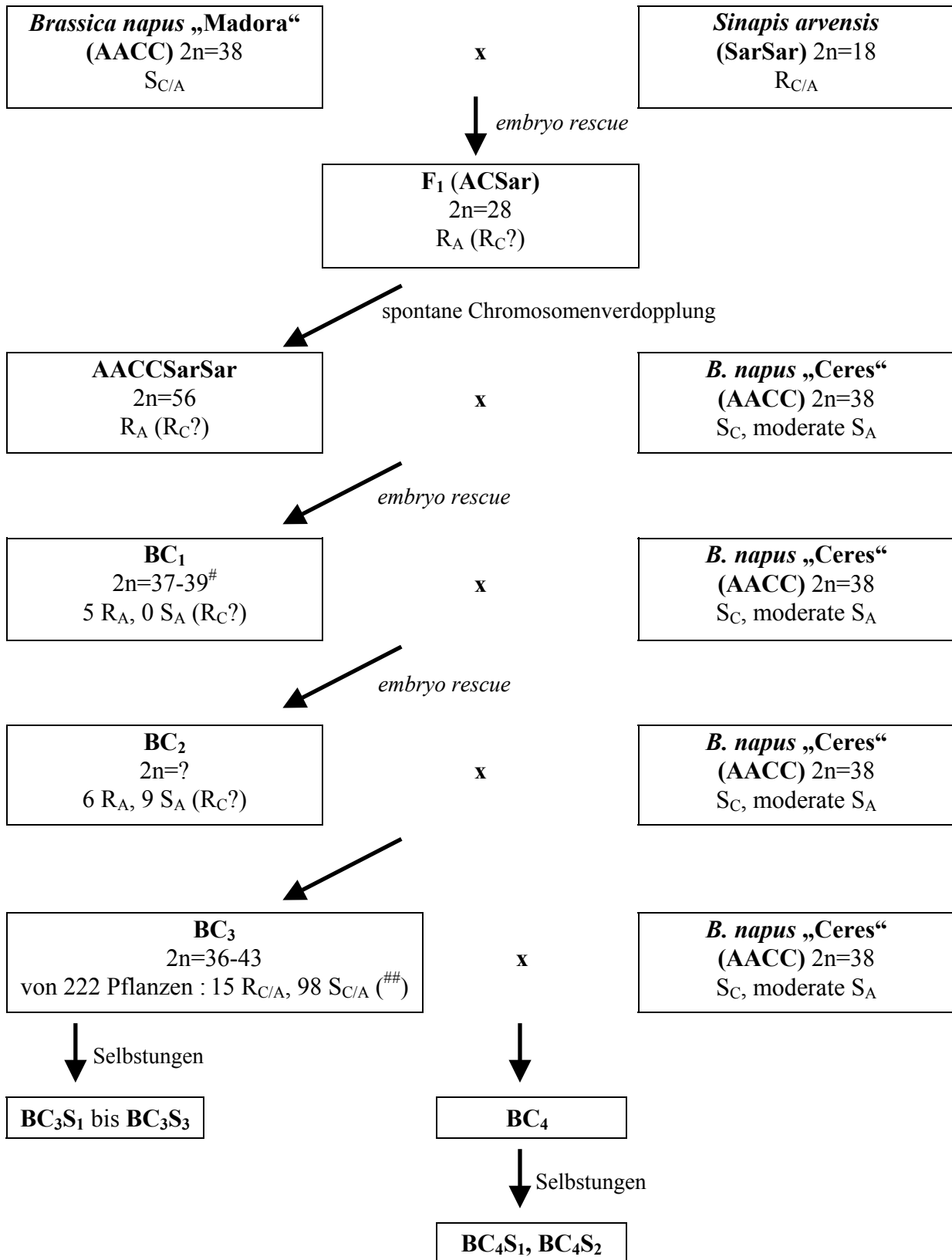


Abb. 2.2 Herkunft der *B. napus*-*S. arvensis*-Linien und Rückkreuzungsprogramm. Genombezeichnungen: A, C und Sar. BC_x = x-te Rückkreuzungsgeneration, S_x = x-te Selbstungsgeneration. Resistenzklassen: R = resistent, S = anfällig, C = Kotyledonen- (in Zus.), A = Adult- (in Zus.), C/A = kombinierte Kotyledonen- und Adultresistenz bzw. -anfälligkeit. [#] = PLÜMPER (1995). ^{##} = SNOWDON *et al.* (2000). Weitere Erklärungen im Text.

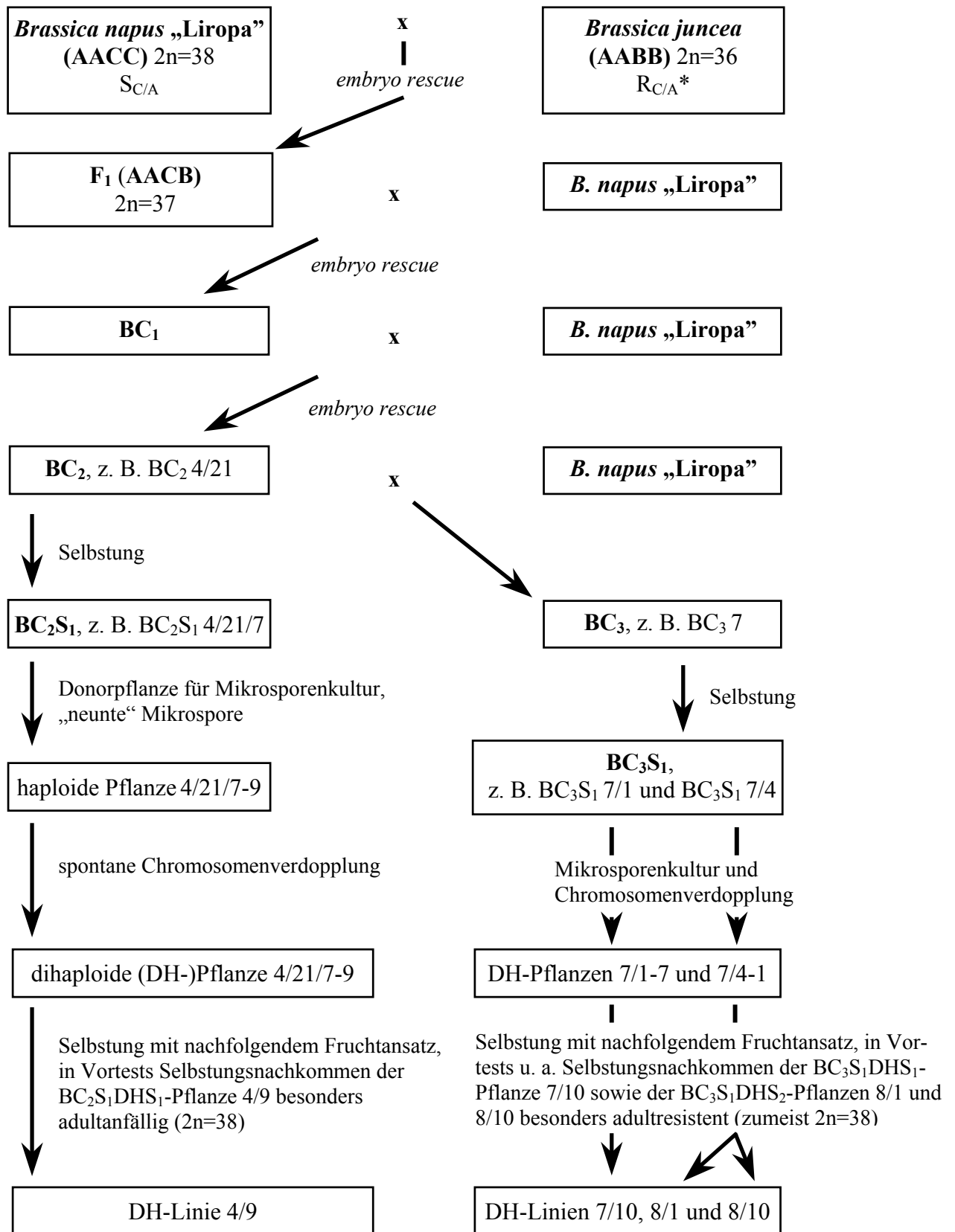


Abb. 2.3 Herkunft der *B. napus*-*B. juncea*-Linien und Analysestand zum Promotionsbeginn. * = Regelfall bei *Tox*⁺-Isolaten von *L. maculans*, Genombezeichnungen: A, B und C. BC_x = x-te Rückkreuzungsgeneration, S_x = x-te Selbstungsgeneration. Resistenzklassen: R = resistent, S = anfällig, C = Kotyledonen- (in Zus.), A = Adult- (in Zus.), C/A = kombinierte Kotyledonen- und Adultresistenz bzw. -anfälligkeit (siehe auch SACRISTÁN & GERDEMANN 1986, WINTER & SACRISTÁN 1998).

2.1.2 Pilzpathogene

Für die Resistenztests wurden zwei aggressive Isolate (Tox^+) von *Leptosphaeria maculans* verwendet: W4 (Herkunft: Lehrstuhl für Phytopathologie, TU München-Weihenstephan, Freising; isoliert an *Brassica napus*, siehe auch HASSAN *et al.* 1991) und M1. Letzteres gehört zu denjenigen australischen Isolaten, die in der Lage sind, die Resistenz der *Brassica*-Arten mit dem B-Genom, insbesondere die von *B. juncea*, zu durchbrechen (PURWANTARA *et al.* 1998). M1 wurde von Barbara Howlett (University of Melbourne/Australien) ebenfalls an Raps isoliert und gelangte über Kooperationsbeziehungen mit kommerziellen Partnern (Plant Genetic Systems, Aventis CropScience) an das Institut für Biologie – Angewandte Genetik (E. DIEDERICHSEN/IAG, pers. Mitteilung).

2.2 Methoden

2.2.1 Allgemeine Kulturbedingungen

2.2.1.1 Pflanzenanzucht aus Saatgut

Das Ankeimen des Saatguts der Rückkreuzungslinien und Referenzgenotypen erfolgte auf feuchtem Filterpapier in Glas-Petrischalen (\varnothing 9 cm). Die Schalen blieben in der Regel drei Tage im Kulturraum, der bei 20-22 °C und 16-24 Stunden Licht (Philips TLD 50 W 83 HF und 84 HF) betrieben wurde. Die Lichtstärke lag bei 3000-5000 Lux (30-80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Saatgut aus *Coincya monensis*-Kreuzungen und -Selbstungen, das nicht mehrwöchig bei 4 °C gelagert, sondern in der Regel unmittelbar nach der Abreife wieder für neue Versuche eingesetzt wurde, mußte aufgrund der Keimruhe mindestens zwei Wochen angekeimt werden. In einigen Fällen wurde darüber hinaus das Aufplatzen der Samenschale durch ein leichtes Quetschen der gequollenen Samen mit dem Finger unterstützt.

Nach der Ankeimung wurden die Pflanzen in Tontöpfe (\varnothing 4 bzw. 5 cm) bzw. in Quickpots (Paletten à 7 x 11 Stück) mit „Einheitserde P“ + 10 % (v/v) Kristall-Quarzsand pikiert und im Gewächshaus kultiviert. Eine Anzucht in Tontöpfen diente in erster Linie der Schaffung günstiger mikroklimatischer Voraussetzungen zur Wurzelspitzenabnahme (cytologische Untersuchungen, Abschnitt 2.2.4). Konnte auf diese verzichtet werden, kamen die weniger Arbeitsintensität erfordernden Quickpots zum Einsatz. Vier bis fünf Wochen nach dem Pikieren - nach Wurzelspitzenabnahmen und Untersuchungen zum Resistenzverhalten der Kotyledonen (siehe Kap. 2.2.3) - wurden die Jungpflanzen in Vierkant-Plastiktöpfe (\varnothing 9 bzw. 13 cm) mit „Einheitserde T“ + 10 % (v/v) Kristall-Quarzsand umgetopft.

Die Bedingungen im Gewächshaus unterlagen starken jahreszeitlichen Schwankungen; selbst im Winter wurden jedoch 18 °C nicht unterschritten. Von Oktober bis April wurde Zusatzlicht (14000 Lux, 15-16 Stunden täglich, Osram HQIT 400) gegeben. Bei intensiver Sonneneinstrahlung waren im Sommer Temperaturen über 30 °C nicht selten. In den Folienzelten, in denen die Pflanzen nach der Kotyledoneninokulation drei Tage lang bei hoher Luftfeuchtigkeit inkubiert wurden (Kap. 2.2.3), wurden teilweise Temperaturen über 35 °C gemessen.

Die Klimakammer wurde für Resistenztests bei 23/20 °C (Tag/Nacht), 16 Stunden Licht (Osram HQ/E, 9000 Lux, 350 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) und ca. 85 % relativer Luftfeuchtigkeit betrieben.

Wintermaterial (*B. napus*-*S. arvensis*-Linien, *B. napus*-*B. juncea*-Linien bis auf DH-BC₁-Generationen mit *B. napus* „Loras“) wurde sechs Wochen bei 4 °C und mindestens acht Stunden Licht (ca. 400 Lux) vernalisiert, um eine Blühinduktion zu erreichen.

Kurz soll an dieser Stelle auf die Technik des Erhaltens interessanter, bereits adultbonitierter Genotypen eingegangen werden. Adultanfällige Pflanzen, wie z. B. die BC₂S₁DHS₃ 4/9-1-32 der *B. napus*-*B. juncea*-Linien, wurden, wie auch mit adultresistenten Individuen vielfach praktiziert, nach der äußeren Adultbonitur und ggf. einem fotografischen Erfassen der Symptome wieder in frische Erde [Plastiktöpfe, Durchmesser 13 cm; „Einheitserde T“ + 10 % (v/v) Kristall-Quarzsand] überführt. Dies geschah aber deutlich tiefer als ursprünglich, so daß die Pflanze in die Lage versetzt wurde, sich über Adventivwurzeln, die oberhalb der oft stark durch den Pilz geschädigten Region entsprangen, zu versorgen. Eine Vernalisation erfolgte dann erst nach einem erfolgreichen Wiederanwachsen, frühestens drei Wochen nach der Bonitur.

2.2.1.2 Pflanzliche *in vitro*-Kultur (*in ovulo*-Embryokultur)

Pflanzliche *in vitro*-Kulturen spielten im Rahmen dieser Arbeit nur eine untergeordnete Rolle. Bei der Erstellung neuer Rückkreuzungs- und Selbstungsgenerationen konnte bei allen drei Gruppen weitgehend auf solche Methoden verzichtet werden. Da es aufgrund der Reduktion des Fremdchromatins im Rapshintergrund kaum noch zu postzygotischer Inkompatibilität zwischen den Kreuzungspartnern kam, konnte das Saatgut der neuen Generationen direkt an der Pflanze abreifen.

Zur Bestätigung einer im Laufe der Untersuchungen aufgestellten Hypothese zur Beteiligung eines epistatischen Gens an der Interaktion der *B. napus*-*B. juncea*-Linien mit dem Isolat M1 (siehe Kap. 3.1.3) wurde eine *in ovulo*-Embryokultur (SACRISTÁN & GERDEMANN 1986) durchgeführt.

Beide in Tabelle 2.3 in ihrer Zusammensetzung aufgeführten Medien, MS-11 und G-1 (SACRISTÁN & GERDEMANN 1986), wurden mit *A. bidest.* hergestellt, auf einen pH-Wert von 5,75 eingestellt und 15 Minuten autoklaviert (121 °C, 200 kPa). Die Basalmedien folgten den Angaben von MURASHIGE & SKOOG (1962, MS-11) und GAMBORG *et al.* (1968, G-1). Die aufgeführten Substanzen (Qualitätsstufe „zur Analyse“) wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen. Hersteller des anstelle von Gelrite verwendeten Bitek™ Agars ist die Firma Difco (Detroit/USA).

Die Schoten wurden 18-22 Tage nach der Bestäubung abgenommen und 20 Minuten in 20 % NaClO (v/v einer technischen Lösung, ca. 3,75 % aktives Chlor), versetzt mit einem Tropfen Tween 20, sterilisiert. Anschließend wurden sie kurz in Ethanol (70 %) getaucht und dann dreimal in sterilem *A. bidest.* gewaschen. Mit einem Mikroskalpell wurden die Schoten an der Verwachsungsnaht geöffnet. Die Samenanlagen wurden mit einer Pinzette möglichst unverletzt auf Petrischalen (Ø 9 cm) mit MS-11 überführt (Kulturraum). Keimende Samenanlagen wurden, in den Unterteilen der Original-Petrischalen verbleibend, in umgestülpte Glaskulturgefäße (Ø 9 cm) überführt.

Tab. 2.3 Zusammensetzung der Kulturmedien für die *in ovulo*-Kultur

	MS-11 mg l ⁻¹	G-1 mg l ⁻¹
MAKROELEMENTE		
KNO ₃	1900	1900
NH ₄ NO ₃	1650	1650
CaCl ₃ · 2 H ₂ O	440	440
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	370	370
KH ₂ PO ₄	170	170
Na ₂ EDTA · 2 H ₂ O	37,3	37,3
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	27,8	27,8
MIKROELEMENTE		
H ₃ BO ₄	6,2	6,2
MnSO ₄ · 4 H ₂ O	22,3	22,3
ZnSO ₄ · 4 H ₂ O	8,6	8,6
KJ	0,83	0,83
Na ₂ MoO ₄ · 5 H ₂ O	0,25	0,25
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,025	0,025
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,025	0,025
ORGANISCHE BESTANDTEILE		
Nicotinsäure	0,5	1,0
Pyridoxin · HCl	0,5	1,0
Thiamin · HCl	0,1	10,0
myo-Inositol	100	100
Glycin	2,0	2,0
SYNTH. PHYTOHORMONE		
NAA		0,2
Saccharose	10000	30000
Bitek™ Agar	2500	2500

Dort entwickelten sie sich größtenteils direkt zu normalen Pflanzen, die, wie in Abschnitt 2.2.1.1 beschrieben, im Gewächshaus pikiert und zunächst einige Tage im Folienzelt bei hoher Luftfeuchtigkeit akklimatisiert wurden. Einige Keimlinge, insbesondere solche mit verzögerter Entwicklung, bildeten unter *in vitro*-Bedingungen zunächst teratomartige Strukturen aus, die zumeist sekundäre Sprosse bildeten. Nach Subkulturen auf MS-11 konnten auch daraus morphologisch normale Sprosse regeneriert werden. Diese wurden neun Wochen nach Beginn der *in ovulo*-Embryokultur zur Bewurzelung auf G1 überführt und konnten weitere vier Wochen später ebenfalls pikiert und ins Gewächshaus überführt werden.

2.2.1.3 Kultur der Pilzpathogene und Gewinnung von Inokulum

Beide Isolate, W4 und M1, wurden in Form steriler Pycnidiosporen-Suspensionen bei -20 °C gelagert. Diese waren in der Regel bereits auf die für die Resistenztests benötigte Sporendichte von $1 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$ (im folgenden „Standardsporensuspension“ genannt) eingestellt. So konnten die gelagerten Sporensuspensionen entweder direkt zu phytopathologischen Untersuchungen eingesetzt oder aber zur Gewinnung neuen Inokulums verwendet werden. Bei sachgemäßer Lagerung (Auftauen muß unbedingt vermieden werden) weisen die Sporen auch noch nach zwei Jahren eine konstant hohe Virulenz auf. Die Sporenqualität wurde von Zeit zu Zeit mittels Tests an Referenzgenotypen überprüft (Abschnitt 2.2.3.2.2).

Zur Gewinnung von Inokulum wurden wenige Mikroliter der Standardsporensuspension unter sterilen Bedingungen auf Plastikpetrischalen (\varnothing 6 cm) mit modifiziertem V8-Medium [MILLER 1955; 10 % (v/v) Gemüsesaft, z. B. von Albi; 1,6 % (w/v) Agar Agar; angesetzt mit *A. bidest.*; pH-Wert 5,7] plattiert. Die mit Parafilm verschlossenen Platten verblieben drei Tage im Dunkeln.

Danach wurden sie ca. sieben Tage lang unter kurzweiliger Strahlung (nahe an UV; Philips TLD 36/08, $\lambda = 460$ nm) kultiviert, um eine verstärkte Sporulation zu induzieren.

Nach dieser Zeit war in der Regel eine ausreichende Sporenmenge gebildet. Zur Sporenisolation wurden die Platten unter dem Binokular auf die Bildung reifer Pycnidien (Indikator: schleimige Tropfen) untersucht. Geeignete Platten wurden unter sterilen Bedingungen mit ca. 3 ml sterilem *A. bidest.* übergossen, horizontal bewegt und einige Minuten stehengelassen. Nach oberflächlichem „Abkratzen“ des Mycels mit einer Lanzettadel und anschließendem Schütteln erfolgte eine Filtration (10- oder 40- μ m-Gazefilter) zur Entfernung von Mycel- und Agarresten. Eine Neubauer-Zählkammer diente zur Einstellung der Suspension auf die für alle Tests benutzte Sporendichte von 1×10^7 ml⁻¹.

2.2.2 Kreuzungen, Rückkreuzungen und Selbstungen

Für Kreuzungen, Rückkreuzungen und erzwungene Selbstungen (z. B. bei selbstinkompatiblen Genotypen wie *Coincya monensis*) wurden kurz vor der Anthese befindliche Knospen vorsichtig mit einer Pinzette geöffnet und kastriert. Je nach Genotyp konnten pro Blütenstand 3-12 geeignete Knospen ausgewählt werden, die übrigen wurden entfernt. Die Narben wurden mit Pollen des Kreuzungspartners bestäubt und mit einer Cellophantüte gegen Fremdbestäubung geschützt.

Um schneller definierte Nachkommen einer großen Anzahl fertiler Genotypen zu erhalten, wurden vielfach Selbstungen durchgeführt. Damit konnte, ähnlich wie bei Rückkreuzungen, Fremdchromatin reduziert werden. Darüber hinaus sollten Selbstungen von Rückkreuzungsnachkommen mit $2n=38$ Aussagen zur Genetik der Resistenzen und eventuell auch die homozygote Fixierung von Resistenzgenen ermöglichen. Von zur Selbstung vorgesehenen Blütenständen wurden zunächst alle bereits geöffneten Knospen entfernt. Anschließend wurde der Blütenstand mit den noch ungeöffneten Knospen mit einer Cellophantüte gegen Fremdbestäubung geschützt.

2.2.3 Resistenztests

Resistenztests bildeten die Grundlage aller weiteren Untersuchungen. Diese erfolgten entweder unter kontrollierten Bedingungen (Abschnitte 2.2.3.1 bis 2.2.3.2.3; zumeist im Gewächshaus, seltener in der Klimakammer) oder in Form von Feldversuchen (Kap. 2.2.3.2.4).

Im Vordergrund stand zunächst die Frage, wo die Grenze zwischen Resistenz (nachfolgend abgekürzt mit R) und Anfälligkeit (S) zu ziehen ist. Die in den folgenden Kapiteln sowohl für die Ebene der Kotyledonen (Tab. 2.4) als auch für die adulte Pflanze (Tab. 2.6) dargelegten Resistenzgrenzen basierten zunächst auf Beobachtungen unterschiedlicher Symptomausprägungen innerhalb der jeweiligen Genotypen. Sie hatten also anfangs einen stark subjektiven Charakter, insbesondere bei mittleren Boniturnoten. Später erfolgte eine Verifizierung anhand des Resistenzverhaltens der Nachkommenschaften von Genotypen mit unterschiedlichen Boniturnoten.

2.2.3.1 Kotyledonentest und Einordnung der Isolate in Pathogenitätsgruppen

Drei bis sechs Tage nach dem Pikieren erfolgte die Kotyledoneninokulation der in Tontöpfen bzw. Quickpots befindlichen Pflänzchen im Gewächshaus (Kap. 2.2.1.1). Dazu wurde jedes Keimblatt zentral mit einer feinen Nadel epidermal verletzt; darüber wurden mit Hilfe einer

Eppendorf-Pipette 5 µl der Standardsporensuspension (siehe Abschnitt 2.1.1.3) appliziert. Zur Gewährleistung optimaler Startbedingungen für den Pilz verblieben die Pflanzen drei Tage lang in einem Folienzelt mit hoher Luftfeuchtigkeit. Die Pflanzen wurden am Inokulationstag und während der darauffolgenden 24 Stunden nicht gegossen. Die Auswertung erfolgte in der Regel zwischen dem 10. und 24. Tag (oft Beginn erst am 14. Tag; bei einigen Genotypen, wie *Coincya monensis*, bis zum 30. Tag) nach der Inokulation in bis zu sechs Bonituren pro Test.

Nur zu Beginn der hier besprochenen Arbeiten wurden Kotyledonentests auch in der Klimakammer (Kap. 2.2.1.1) durchgeführt. Der Ablauf entsprach dem für das Gewächshaus, auf ein Folienzelt wurde verzichtet.

Die Kotyledonensymptome wurden mit den in Tabelle 2.4 beschriebenen vier Boniturnoten klassifiziert (SNOWDON *et al.* 2000).

Tab. 2.4 Boniturnoten des Kotyledonentests (SNOWDON *et al.* 2000). Klassen: R_C = kotyledonenresistent, S_C = kotyledonenanfällig. Pflanzen mit Boniturnoten ≥ 3 wurden als kotyledonenanfällig klassifiziert (auch Vergabe halber Boniturnoten wie z. B. 2,5).

Boniturnote	Symptome	Klasse
1	Punktförmig-begrenzte Nekrose um die Einstichstelle	R _C
2	Kleine chlorotische Läsion (< 2 mm im Durchmesser)	R _C
3	Moderate chlorotische Läsion (2-5 mm im Durchmesser)	S _C ^a
4	Große chlorotische Läsion (> 5 mm im Durchmesser), in der Regel mit Pycnidienbildung im Spätstadium verbunden	S _C

^a = zu R_C, wenn Läsion erst im Spätstadium (> 3. Bonitur bzw. ≥ 7 Tage nach 1. Bonitur) auftritt

Darüber hinaus wurden die in dieser Arbeit verwendeten aggressiven (Tox⁺-)Isolate von *L. maculans*, W4 und M1, den der besseren internationalen Vergleichbarkeit von Ergebnissen verschiedener Arbeitsgruppen dienenden Pathogenitätsgruppen zugeordnet. Dies geschah anhand

Tab 2.5 Verhalten von Referenzrapsorten gegenüber *Leptosphaeria maculans* in Kotyledonentests und Einordnung der Isolate in Pathogenitätsgruppen (PG). Während die nicht-aggressiven Isolate (PG 1) stets inkompatibel mit Raps interagieren (Kotyledonenresistenz, R_C), zeichnen sich die für diese Arbeit relevanten aggressiven Isolate durch kompatible Reaktionen (Kotyledonenanfälligkeit, S_C) gegenüber einer (PG 2), zwei (PG 3) bzw. allen drei Differentialrapsorten (PG 4) aus (verändert nach MENGISTU *et al.* 1991). I = intermediäres Resistenzverhalten auf Kotyledonenebene.

Differentialrapsorte	Kompatible (S _C) bzw. inkompatible (R _C) Interaktion			
	PG 1	PG 2	PG 3	PG 4
<i>B. napus</i> „Lirabon“	R _C	S _C	S _C	S _C
<i>B. napus</i> „Glacier“	R _C	I/R _C	S _C	S _C
<i>B. napus</i> „Quinta“	R _C	I/R _C	I/R _C	S _C

des in Tabelle 2.5 aufgeführten Differentialrapssortiments, das auf der Publikation von MENGISTU *et al.* (1991) beruht. Die in der Originalveröffentlichung erwähnte, sowohl auf Kotyledonen- als auch auf Adultebene stark anfällige Rapssorte „Westar“ wurde hierbei, wie vielfach üblich (B. KOOPMANN/Universität Göttingen, pers. Mitteilung), durch die Sorte „Lirabon“ ersetzt.

2.2.3.2 Adulttests

Zur Einschätzung des Resistenzniveaus der adulten Pflanzen wurden die in den Abschnitten 2.2.3.2.1 bis 2.2.3.2.3 näher erläuterten Tests durchgeführt, die im wesentlichen im Gewächshaus und nur in Ausnahmefällen in der Klimakammer stattfanden. Unter 2.2.3.2.4 werden darüber hinaus die Feldversuche behandelt, bei denen ebenfalls in erster Linie Aussagen zur Adultresistenz interessierten.

Die Boniturnoten der äußeren Symptome, die - z. T. leicht variiert - in sämtlichen Adulttests Verwendung fanden, zeigt Tabelle 2.6. Die Außenbonitur des Tests mit Doppelinokulation (Kap. 2.2.3.2.1) und des Stengelbasistests (Kap. 2.2.3.2.3) erfolgte mit Hilfe von sechs Noten, wie bei SNOWDON *et al.* (2000) beschrieben. Zusätzlich dazu wurde beim Adulttest an kotyledoneninokulierten Pflanzen (Kap. 2.2.3.2.2) und den Feldversuchen, bei denen keine mechanische Verletzung der Stengelbasis erfolgte, auch die Boniturnote 0 vergeben. Die Vergabe der Boniturnote 1 dieser letztgenannten Tests wurde gegenüber SNOWDON *et al.* (2000) leicht modifiziert.

Tab. 2.6 Noten der äußeren Bonitur der Adulttests (modifiziert nach SNOWDON *et al.* 2000). Klassen: R_A = adultresistent, S_A = adultanfällig. Mit Ausnahme der *B. napus*-*B. juncea*-Linien (siehe Fußnote ^d) galten Pflanzen mit Boniturnoten ≥ 3 als adultanfällig (auch Vergabe halber Boniturnoten wie z. B. 2,5).

Boniturnote	Äußere Symptome	Klasse
0 ^a	Keine Symptome	R _A
1	^b Begrenzte Nekrose im Bereich der Inokulationsstelle ^c Kleine nekrotische Symptome (≤ 5 % stengelumfassend)	R _A
2	Geringfügiger Schaden an der Stengelbasis (≤ 25 % stengelumfassend)	R _A
3	Moderater Schaden an der Stengelbasis (> 25 % und ≤ 50 % stengelumfassend)	S _A ^d
4	Großer Schaden an der Stengelbasis (> 50 % und < 100 % stengelumfassend)	S _A
5	Vollständig stengelumfassender, schwerer Schaden an der Stengelbasis	S _A
6	Pflanzenkollaps	S _A

^a = Boniturnote 0 nur in Adulttest an kotyledoneninokulierten Pflanzen (Kap. 2.2.3.2.2) vergeben

^b = Test mit Doppelinokulation, Stengelbasistest

^c = Adulttest an kotyledoneninokulierten Pflanzen, Feldversuche

^d = *B. napus*-*B. juncea*-Linien: nach Inokulation mit dem Isolat W4 Pflanzen mit Außenbonitur ≤ 3 stets noch R_A; bei M1-Inokulation Pflanzen mit Außenbonitur ≤ 3 noch R_A, wenn Innenbonitur < 4 (wenn keine Innenbonitur: zu R_A)

Bei der großen Mehrheit der Pflanzen wurde parallel zur Außenbonitur auch eine Einschätzung der inneren Schädigung der Stengelbasis vorgenommen. Dies betraf jedoch nicht diejenigen Individuen, die für Kreuzungen und Selbstungen benötigt wurden.

Die Bonitur der inneren Läsionen erfolgte in Anlehnung an HAMMOND & LEWIS (1987) und PLIESKE *et al.* (1998). Abbildung 2.4 verdeutlicht anhand von Skizzen stengelbasisinokulierter Pflanzen die fünf verschiedenen Boniturnoten, die bei allen Adulttests Gültigkeit hatten. Beim Adulttest an kotyledoneninokulierten Pflanzen und den Feldversuchen wurde zusätzlich die Boniturnote 0 (keinerlei innere Symptome) vergeben. Die Noten 1 und 2 wurden der nichtinvasiven Inokulationsmethode gemäß modifiziert. Sie entsprechen Symptomen unterschiedlicher Größe, die nur auf die äußeren Rindenschichten (Note 1) beschränkt waren bzw. geringfügig in das Leitgewebe reichten (Note 2). In beiden Fällen war das Mark völlig intakt.

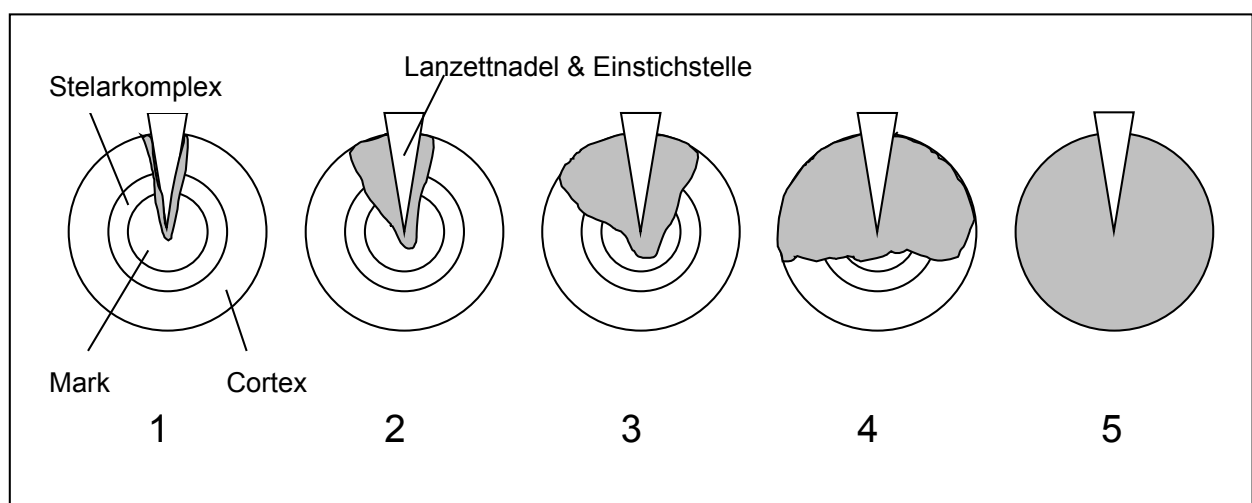


Abb. 2.4 Noten der inneren Bonitur (1-5) und die dazugehörige Befallsstärke (grauer Bereich) anhand von Querschnitten durch die Stengelbasis zum Zeitpunkt der Adultbonitur. Situation bei Test mit Doppelinokulation bzw. Stengelbasistest (verändert nach HAMMOND & LEWIS 1987 und PLIESKE *et al.* 1998; unveröffentlichte Grafik von N. KRONE/IAG, hier leicht verändert).

2.2.3.2.1 Test mit Doppelinokulation

Dieser Resistenztest bildete den Schwerpunkt der phytopathologischen Untersuchungen. Er entspricht einem Stengelbasistest (Kap. 2.2.3.2.3) mit vorgeschalteter Kotyledoneninokulation.

Zunächst erfolgten Kotyledoneninokulation und Kotyledonentest wie im Abschnitt 2.2.3.1 beschrieben. Nach Beendigung der Bonitur der Kotyledonensymptome, einer etwaigen Wurzelspitzenabnahme und nach dem Umtopfen in größere Plastiktöpfe (Kap. 2.2.1.1) wurden die nunmehr vier bis sechs Wochen alten Pflanzen ein zweites Mal inokuliert.

Mit einer Lanzettnadel erfolgte an der Übergangsstelle zwischen Hypo- und Epikotyl eine mindestens 1 cm lange und 1-2 mm tiefe Verletzung. Auf diese wurde dann ein Cellulosestück (aus Polstermaterial der Verpackung der Pasteurpipetten geschnitten) appliziert, das mit 100 µl der Standardsporensuspension (1×10^7 Sporen ml⁻¹, Abschnitt 2.2.1.3) getränkt war. Abschließend erfolgte eine Befestigung des Cellulosestücks mittels Parafilm an der Stengelbasis. Die Pflanzen wurden am Inokulationstag und am Tag danach nicht gegossen. Nach ca. zehn

Tagen wurden Parafilm und Cellulose entfernt. Die Auswertung erfolgte sechs bis sieben Wochen nach der Stengelbasisinokulation.

2.2.3.2.2 Adulttest an kotyledoneninokulierten Pflanzen

Bei diesem Test wurden die Pflanzen dem im Abschnitt 2.2.3.1 beschriebenen Kotyledonentest unterzogen. Um die systemische Ausbreitung des Pilzpathogens studieren zu können, wuchsen die Pflanzen nach dem Umtopfen ohne erneute Inokulation weiter. Die Adultbonitur erfolgte acht bis zehn Wochen nach der Kotyledoneninokulation.

2.2.3.2.3 Stengelbasistest

Hierbei wurde auf eine Kotyledoneninokulation verzichtet. Im Alter von vier bis sechs Wochen erfolgte die Inokulation der Pflanzen an der Übergangsstelle zwischen Hypo- und Epikotyl, wie im Kapitel 2.2.3.2.1 dargelegt. Die Pflanzen wurden sechs bis sieben Wochen nach der Stengelbasisinokulation im adulten Zustand bonitiert.

2.2.3.2.4 Feldversuche

In den Jahren 1997/98 (in der Phase der Vorbereitung auf die Promotion angelegt), 1998/99 und 2000/01 fanden unmittelbar neben dem Institut (Abb. 2.5) drei Feldversuche statt, die Bestandteil der phytopathologischen Untersuchungen waren. Hierbei wurde sowohl Sommer- als auch Wintermaterial der fortschreitenden Rückkreuzungsprogramme der drei Gruppen sowie Kontrollgenotypen insbesondere auf ihre Adultresistenz unter Feldbedingungen geprüft. Die Inokulationen erfolgten jeweils mit dem Isolat W4 von *L. maculans*. Aufgrund der Dynamik der jeweiligen Rückkreuzungsprogramme (Veränderung in der Einschätzung von Linien mit „vorrangigem Interesse“) war eine mehrjährige Prüfung derselben Genotypen oft nicht möglich.

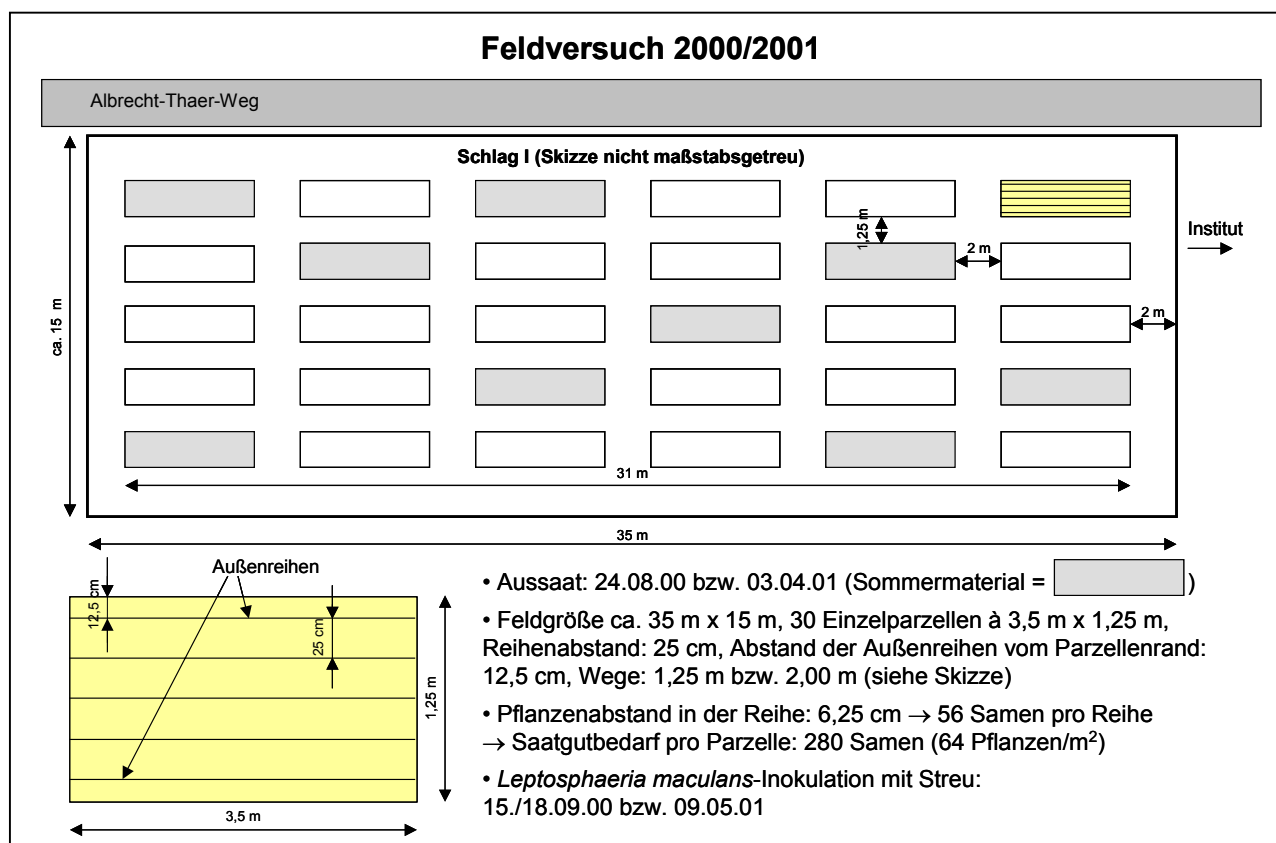
Ein erstes Ziel bestand in der Entwicklung einer geeigneten Inokulationsmethode unter den hier herrschenden Bedingungen (geringer natürlicher *L. maculans*-Infektionsdruck). Diese sollte dann unter Beachtung des relativierenden Einflusses vielfältiger anderer biotischer und abiotischer Faktoren und unter Anwendung einer hinreichenden Boniturmethode den Vergleich von Resultaten relevanter Genotypen im Gewächshaus mit denen unter praxisnahen Bedingungen ermöglichen.

Die Pflanzen im Feldversuch 1997/98 wurden durch Übersprühen mit Hilfe der Pflanzendüngerspritze Gloria 142 (Füllinhalt 10 l; Fa. Gloria, Wadersloh) inokuliert. Dabei wurden die Pflanzen einer jeden Parzelle knapp vier Wochen nach der Aussaat im 4-5-Blatt-Stadium mit jeweils ca. 630 ml einer Sporensuspension der Konzentration 6×10^5 Sporen/ml übersprüht. Im Feldversuch 2000/01 erfolgte die Inokulation mittels zwischen die Jungpflanzenreihen gestreuter, getrockneter und mit dem Pilz infizierter Pflanzenreste (Streu) aus Gewächshausversuchen. Die Wintergenotypen des Feldversuchs 1998/99 wurden zunächst durch Sprühen und später zusätzlich durch Streu inokuliert. Tabelle 2.7 zeigt die wichtigsten Parameter der drei Feldversuche.

Am Beispiel des Feldversuchs 2000/01 verdeutlicht Abbildung 2.5 den prinzipiellen Aufbau des Feldes. Die Einzelparzellen hatten eine Größe von 3,50 m x 1,25 m mit jeweils fünf Reihen. Die Reihen waren 25 cm voneinander entfernt. Der Pflanzenabstand in der Reihe betrug 6,25 cm (Auslege-Soll: 56 Samen pro Reihe, 280 Samen pro Parzelle, 64 Pflanzen pro m²).

Tab. 2.7 Die Feldversuche und ihre Parameter. Inokulation mit Isolat W4 von *L. maculans*.

Parameter	Feldversuch 1997/98	Feldversuch 1998/99	Feldversuch 2000/01
Aussaat Wintermaterial	21.08.97	26.08.98	24.08.00
Parzellenanzahl Wintermaterial	20	25	22
Inokulationsart Wintermaterial	Sprühen (630 ml Sporensuspension mit $c = 6 \times 10^5$ Sporen/ml pro Parzelle)	Sprühen (wie im Feldversuch 1997/98) und Streu	Streu
Inokulationsdatum Wintermaterial	16.09.97	22.09.98 (Sprühen) 11/98 (Streu)	15./18.09.00
Aussaat Sommermaterial	-	01.04.99	03.04.01
Parzellenanzahl Sommermaterial	-	3	8
Inokulationsart Sommermaterial	-	Streu	Streu
Inokulationsdatum Sommermaterial	-	29.04.99	09.05.01
Boniturzeitraum	14.07.-29.07.98	20.07.-30.08.99	20.06.-24.07.01

**Abb. 2.5** Anlage und Daten des Feldversuchs 2000/2001.

2.2.3.3 Resistenzgenetik und statistische Auswertungen

Anhand der Spaltungsergebnisse von Selbstungs-, Kreuzungs- bzw. Rückkreuzungsnachkommenschaften wurden für *Coincya monensis*-Genotypen (in Kotyledonentests) und Rückkreuzungsnachkommen mit Adultresistenzen aus *C. monensis* bzw. *B. juncea* sowie Raps-Karyotyp ($2n=38$, keine Hinweise auf Additions- oder Substitutionschromosomen in GISH-Analysen, Kap. 2.2.4.3; in Tests mit Doppelinokulation) Nullhypothesen zur Vererbung der jeweiligen Resistenz nach den Mendelschen Regeln aufgestellt. Die Prüfung dieser erfolgte mit Hilfe des χ^2 -Homogenitätstests und des χ^2 -Anpassungstests unter Einbeziehung der YATES-Korrektur.

Zur Beantwortung der Frage, ob Unterschiede in der Verteilung der Boniturnoten bei verschiedenen Genotypen im Feldversuch 2000/01 signifikant sind, wurden als parameterfreie Verfahren der Varianzanalyse mit Hilfe der Software SPSS (Version 11.0) der H-Test (KRUSKAL-WALLIS-Test) und der U-Test von MANN & WHITNEY durchgeführt (cf. KÖHLER *et al.* 1995). Die Verteilungen der äußeren Adultboniturnoten von Rückkreuzungsnachkommenschaften der *B. napus*-*S. arvensis*-Linien (gegenüber dem Isolat W4) und der *Brassica*-Arten mit dem B-Genom (Isolat M1) wurden anhand von Box-Whisker-Plots (cf. KÖHLER *et al.* 1995) verglichen. Dies erfolgte ebenfalls mit Hilfe der Software SPSS (Version 11.0).

2.2.4 Klassische Cytologie und molekular-cytogenetische Untersuchungen

2.2.4.1 Klassische Mitose-Untersuchungen

Die Mitose-Untersuchungen erfolgten an metaphasearretierten meristematischen Zellen von Wurzelspitzen und Griffeln. Wurzelspitzen- und Griffelabnahmen wurden in den Morgenstunden durchgeführt. Sie waren bis 10.00 Uhr abgeschlossen.

In den Wintermonaten wurden die Pflanzen zwei Tage vor der Wurzelspitzenabnahme in eine unbeheizte Abteilung gebracht und einen halben Tag vor der Abnahme wieder in die Wärme überführt. Das diente der Maximierung und Synchronisierung der Zellteilungsaktivität. Am Tag der Wurzelspitzenabnahme wurden die Pflanzen nicht gegossen. Bei der Abnahme, die drei bis vier Wochen nach dem Pikieren (in der Regel nach der letzten Kotyledonenbonitur) erfolgte, war auf hinreichend durchwurzelte Erdballen der in Tontöpfen (Kap. 2.2.1.1) befindlichen Pflanzen zu achten. Mit einer Pinzette wurden mehrere, 1-2 cm lange Wurzelspitzen (gelblich-weißes Aussehen) von den Pflanzen entnommen und für 2,5 Stunden in offene Röhrchen mit 2 mM 8-Hydroxychinolin (C_9H_7NO ; Serva, Heidelberg) zur Metaphasenarretierung überführt. Nach dieser Behandlung wurden die Untersuchungsobjekte in Ethanol (96 %)/Eisessig im Verhältnis 3:1 fixiert. Bis zu ihrer Verwendung für Quetsch- oder *droplet*-Präparate konnten die Wurzelspitzen in verschlossenen Röhrchen bei 4 °C bis zu einem Jahr ohne Qualitätsverlust aufbewahrt werden.

Alternativ zur Wurzelspitzenmethode wurden Griffel verwendet, wie von WU *et al.* (1997) vorgeschlagen. Hier kann man von einer höheren Anzahl sich teilender Zellen ausgehen. Dies ist gerade bei Pflanzen mit einem eher niedrigen Mitose-Index, wie bei den Arten der *Brassica*-Verwandtschaft, wertvoll. Darüber hinaus stehen sie oft über einen wesentlich längeren Zeitraum zur Verfügung. 1,5-6 mm lange Griffel aus ungeöffneten Blütenknospen wurden im Gewächshaus

unter dem Binokular vollständig präpariert. Sie verblieben 3,5-4 Stunden lang in 2 mM 8-Hydroxychinolin. Die Fixierung entsprach der für die Wurzelspitzen beschriebenen.

Die Färbung der Wurzelspitzen und Griffel erfolgte für 3 bis 24 Stunden in Orcein-HCl-Lösung. Die Lösung wurde wie folgt hergestellt: 10 g Orcein (Merck, Darmstadt) wurden mit 250 ml Essigsäure (96 %) eine Minute langsam gekocht. Nach der Abkühlung wurden 275 ml *A. dest.* und 50 ml 1N HCl hinzugegeben, anschließend wurde geschüttelt und filtriert. Bei einer mehr als einwöchigen Aufbewahrung der Lösung erfolgte vor der Verwendung ein erneutes Filtrieren.

Nach der Färbezeit wurde auf einem Objektträger die Spitze (1-2 mm), der Ort des Wurzelspitzenmeristems, abgeschnitten. Aus dieser wurde mit einem Tropfen verdünnter Karmin-Essigsäure [Karmin-Essigsäure (siehe Kap. 2.2.4.2)/Essigsäure (45 %), 1:1, v/v] unter moderatem Erhitzen das Quetschpräparat hergestellt. Zur Griffelfärbung wurde darüber hinaus auch Orcein ohne Zusatz von HCl verwendet. In dieser Färbelösung konnten die Objekte bis zu einer Woche ohne Qualitätsverlust verbleiben.

Zur Untersuchung der Metaphasen stand das Zeiss-System-Mikroskop Standard 14 (Zeiss, Oberkochen) zur Verfügung. Die Chromosomenzahl wurde stets mit 1250facher Vergrößerung unter Verwendung von Immersionsöl ermittelt. Für die Mikrofotografien diente das Zeiss-Fotomikroskop III Stativ (Baujahr 1979; Zeiss, Oberkochen), wobei der Schwarz-Weiß-Film „AGFAORTHO 25 Professional“ (Agfa, Leverkusen) verwendet wurde. Digitale Schwarz-Weiß-Bilder wurden am Mikroskop DMRX (Leitz, Wetzlar) mit Hilfe der *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) aufgenommen.

Um den Einfluß von Fehlzählungen hinreichend zu verringern, wurde die Chromosomenzahl einer Pflanze einer Nachkommenschaft erst dann als gesichert betrachtet, wenn sie in mindestens fünf Zellen aus wenigstens drei Wurzelspitzen oder Griffeln eindeutig bestimmt werden konnte. Falls nur in drei oder vier Zellen Eindeutigkeit erzielt werden konnte, mußten mindestens fünf weitere Zellen eine hohe Evidenz (Unsicherheit bei nur einem Chromosom) für die gleiche Anzahl aufweisen.

Erfolgte bei Zellen derselben Pflanze unter Anlegung der oben beschriebenen Kriterien der Nachweis unterschiedlicher Chromosomenzahlen, und wurden diese unterschiedlichen Zahlen auch mindestens zweimal innerhalb derselben Wurzelspitze bzw. desselben Griffels gefunden, so wurden diese Zahlen gleichberechtigt als „Chromosomenzahlen“ dieser nunmehr als mixoploid angesehenen Pflanze betrachtet.

2.2.4.2 Klassische Meiose-Untersuchungen

Die Meiose-Untersuchungen folgten weitgehend der Vorgehensweise von BELLIN (1988). Hierzu wurden zwischen 10.00 und 11.00 Uhr Teile von Blütenständen, die Knospen einer Länge von 1-2 mm aufwiesen, mit der Pinzette abgenommen. Diese wurden dann direkt in langen Röhrchen in Ethanol (96 %)/Eisessig im Verhältnis 3:1 fixiert. Die Fixierlösung wurde nach ca. acht Stunden einmal erneuert. Am nächsten Tag wurden die Knospen zur endgültigen Lagerung in Ethanol (50 %, z. T. auch 70 %) überführt.

Für die mikroskopischen Untersuchungen wurden relevante Knospen (weiß, Größenordnung wie oben erwähnt) unter dem Binokular in einigen Tropfen verdünnter Karmin-Essigsäure der Größe

nach geordnet. Anschließend wurde eine Knospe mittlerer Größe geöffnet. Zwei der freigelegten Antheren wurden entnommen, je einmal mit einer Lanzettadel durchgeschnitten und in einem Tropfen konzentrierter, ca. 0,5 %iger Karmin-Essigsäure [5 g Karmin (Merck, Darmstadt), 500 ml Eisessig und 500 ml *A. dest.* 2-3 h unter Nutzung eines Rückflußkühlers mit Siedesteinchen gekocht, abgekühlt, zweimal filtriert] nach leichtem Quetschen und moderatem Erhitzen hinsichtlich ihres Teilungsstadiums bestimmt. Präparate mit Zellen, die sich in relevanten Meiosestadien (z. B. Prophase I oder Metaphase I) befanden - ansonsten Nutzung der nächstgrößeren bzw. nächstkleineren Knospen - wurden nunmehr unter weiterer Zugabe von konzentrierter Karmin-Essigsäure über der Bunsenbrennerflamme kurz zum Sieden gebracht und stärker gequetscht. Auswertungen und Fotografien wurden bereits im Kapitel 2.2.4.1 beschrieben.

2.2.4.3 Genomische *in situ*-Hybridisierung (GISH)

Zur Detektion von Chromatin unterschiedlicher parental Genome wurde an Rückkreuzungsnachkommen und an Kontrollgenotypen (*Brassica juncea*, *B. carinata*, *B. nigra*, *B. napus*, *C. monensis* und *S. arvensis*) die Methode der Genomischen *in situ*-Hybridisierung (GISH) durchgeführt. Diese erfolgte modifiziert nach SNOWDON *et al.* (1997a) und SNOWDON *et al.* (2000).

Im Vordergrund standen Untersuchungen an mitotischen Metaphasechromosomen. Hierzu wurden Wurzelspitzen oder Griffel verwendet, die, wie im Abschnitt 2.2.4.1 beschrieben, abgenommen, metaphasearretiert, fixiert und gelagert wurden.

Die GISH-Untersuchungen zur Meiose entsprachen weitestgehend den nachfolgend für mitotische Gewebe beschriebenen Methoden. Anstatt von Wurzelspitzen oder Griffeln wurden die *droplet*-Präparate hierfür mit den vier restlichen Antheren einer Knospe hergestellt, die nach den im Abschnitt 2.2.4.2 beschriebenen Anfangsuntersuchungen noch vorhanden waren.

Die für diese Methode benutzten Superfrost-Objekträger (Roth, Karlsruhe) wurden zunächst in Spülmaschine gewaschen und danach in *A. bidest.* gelagert. Spätestens einen Tag vor der Benutzung erfolgte ein Abwischen mit Ethanol (70 %). Anschließend wurden die Objekträger mit einem Papiertuch abgetrocknet und bis zum eigentlichen Gebrauch bei -20 °C gelagert.

Präparate nach der Tröpfchen-Methode (*Droplet Preparations*)

Möglichst 15-20 Wurzelspitzen oder Griffel (je nach Verfügbarkeit auch nur 5-10) einer Pflanze wurden kurz in *A. bidest.* und danach ca. 15 Minuten lang in 1 x Enzympuffer [angesetzt und autoklaviert: 10 x Enzympuffer (SCHWARZACHER & HESLOP-HARRISON 2000), 40 mM Citronensäure ($C_6H_8O_7 \times H_2O$), 60 mM Tri-Natrium-Citrat ($Na_3C_6H_5O_7 \times 2 H_2O$), pH-Wert 4,6] gewaschen. Die 1-2 mm langen Enden der Wurzelspitzen bzw. die vollständigen Griffel wurden anschließend in ein 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 50 µl 1 x Enzymlösung überführt und bei 37 °C 90 Minuten (Wurzelspitzen) bzw. 3-24 Stunden (Griffel) lang verdaut. Grundsätzlich wurden ältere Griffel länger protoplastiert als jüngere. Die Enzymlösung bestand aus 2 % Cellulase (w/v; Calbiochem, La Jolla/USA) und 20 % Pectinase (v/v, von *Aspergillus niger*; Sigma-Aldrich, Steinheim), gelöst in 1 x Enzympuffer. Sie wurde filtriert (0,2 µm) und aliquotiert (50 µl) bei -20 °C gelagert.

Nach Ablauf der Verdauzeit wurde die Enzymlösung entfernt und das Gewebe dreimal vorsichtig mit 250 µl 1 x Enzympuffer gespült. Dabei wurde der Puffer jedes Mal nach dem Herabsinken der

Wurzelspitzen bzw. Griffel bis zum Grund des Reaktionsgefäßes entfernt. Die Lösung wurde jedoch nicht vollständig abgesaugt, damit die Wurzelspitzen bzw. Griffel nicht verletzt wurden. Um ein klares Cytoplasma zu erhalten, erfolgte anschließend ein Ersetzen der Lösung durch 60 %ige Essigsäure. Die Essigsäure wurde mindestens 4x vorsichtig erneuert und dann 10-15 Minuten stengelassen. Ein leichtes zwischenzeitliches Schütteln und Zentrifugieren wirkte sich positiv auf die Protoplastierung aus. Danach wurden die Wurzelspitzen oder Griffel in 100 µl Fixativ (Ethanol/Eisessig, Kap. 2.2.4.1 und 2.2.4.2) überführt und zumindest kurz bei -20 °C aufbewahrt (dort auch Lagerung über mehrere Monate möglich).

Unmittelbar vor der Herstellung der Präparate erfolgte unter mehrmaligem Pipettieren mit einer engen Spitze das Aufbrechen des Materials. Von der nunmehr zumeist klaren Lösung wurden 10 µl auf die -20 °C kalten Superfrost-Objektträger pipettiert. In der Regel erfolgte darüber hinaus die Zugabe von 10 µl Fixativ; nur bei Protoplastierungen einer unterdurchschnittlichen Anzahl von Wurzelspitzen bzw. Griffeln wurde darauf verzichtet. Um ein Anschwellen der Chromosomen zu bewirken, wurden die Präparate angehaucht bzw. für 5 Minuten in eine 25 °C warme Feuchtekammer überführt. Die bei Raumtemperatur mindestens 15 Minuten auf dem Objektträger getrockneten Präparate wurden abschließend mit dem Phasenkontrastmikroskop angesehen. Solche mit geringen Metaphaseraten oder viel Hintergrund wurden verworfen. Die so hergestellten Präparate konnten über mehrere Wochen bei Raumtemperatur gelagert werden.

Herstellung der DNA-Sonden mittels Nick-Translation

Die Nick-Translation ist eine effektive Methode zur radioaktiven oder Fluoreszenz-Markierung genomischer DNA oder größerer klonierter Inserts in Plasmiden (SCHWARZACHER & HESLOP-HARRISON 2000). Die Reaktion beruht auf der Aktivität zweier Enzyme, der Desoxyribonuklease I (DNase I, in der Regel aus Säugetieren) und der DNA-Polymerase I (aus *Escherichia coli*). Die DNase I bewirkt in zufälligen Abständen Einzelstrangbrüche (*nicks*) im DNA-Doppelstrangmolekül. Die DNA-Polymerase I hat drei Aktivitäten: eine Exonuklease-Funktion, die einzelne Basen aus dem *nick* in 5'-3'-Richtung entfernt, eine Polymerase-Funktion, die neue Nukleotide an den 3'-*nick* durch Kopieren der *template*-DNA anfügt, und eine 3'-5'-Korrekturleseaktivität. Markierte Nukleotide, in diesen Untersuchungen Digoxigenin-11-dUTP (Roche, Mannheim; indirekte Detektion über Antikörper) bzw. das später direkt am Fluoreszenzmikroskop detektierbare Cy3-dUTP (FluoroLink™Cy3-dUTP = Cy3-AP3-dUTP = 5-Amino-propargyl-2'-deoxyuridin 5'-triphosphat gekoppelt an Cy3-Fluoreszenzfarbstoff; Amersham, Freiburg), werden so in den neu synthetisierten DNA-Strang eingebaut. Kommerziell verfügbare Enzym-Mixe, die die beiden relevanten Enzyme enthalten, führen zu einer hohen Markierungseffizienz und ergeben Probenlängen von 200-300 bp.

Der nachfolgend beschriebene Ablauf der Nick-Translation basiert auf einem Protokoll von MANIATIS *et al.* (1975). An dieser Stelle soll exemplarisch die Herstellung einer mittels Nick-Translation markierten *Coincya monensis*-Sonde mit Raps-*blocking*-DNA gezeigt werden (siehe auch Tab. 2.8). Diese wurde danach bei GISH-Untersuchungen an *B. napus*-*C. monensis*-Rückkreuzungsnachkommen zur Detektion von *C. monensis*-Chromatin eingesetzt. Ausgegangen wurde von 0,1-2,0 µg zu markierender DNA, die mit Hilfe der CTAB-Methode (Kap. 2.2.5.1.1) isoliert wurde (z. B. von *C. monensis*, 1,20 µl mit $c = 0,150 \mu\text{g}/\mu\text{l} \rightarrow 0,18 \mu\text{g}$). Diese wurde mit

10 µl dNTP-Mix versetzt. Für den dNTP-Mix wurden 2 Vol. dTTP, 3 Vol. dATP, 3 Vol. dCTP und 3 Vol. dGTP (fertig im *Nick Translation Kit* von Roche, Mannheim) mit 1 Vol. Digoxigenin-11-dUTP (Angebotsform 1mM, auf 0,4 mM verdünnt) oder 1 Vol. Cy3-dUTP (25 nmol, unverdünnt) versetzt. Hinzu kamen 2 µl 10 x Puffer (*Nick Translation Kit*). Mit 4,8 µl sterilem *A. bidest.* wurde auf 18 µl aufgefüllt. Nach der Zugabe von 2 µl Enzym-Mix (*Nick Translation Kit*) erfolgte eine Inkubation von 90-180 min bei 15 °C im Wasserbad. Nach dieser Zeit wurde die Reaktion durch Zugabe von 8 µl 50 mM EDTA (pH 8,0; autoklaviert) gestoppt ($\Sigma = 28 \mu\text{l}$). Anschließend kamen die Reaktionsgefäße 10 min lang in ein 65 °C heißes Wasserbad, danach 1-2 min auf Eis.

Nun erfolgte die Zugabe eines 50fachen Überschusses der durch Autoklavieren auf eine Länge von 100-200 bp gebrachten *blocking*-DNA (auch als Kompetitor-DNA bezeichnet; z. B. von *B. napus*, beliebige Sorte, hier 9 µg mit $c = 0,20 \mu\text{g}/\mu\text{l} \rightarrow 45 \mu\text{l}$). Das dient der Erhöhung der Spezifität der Sonde (siehe auch Abschnitt „GISH *s. str.*“). Nachdem 6 µl 4 M LiCl hinzugefügt worden waren ($\Sigma = 79 \mu\text{l}$) wurde mit sterilem *A. bidest.* (in der Beispielrechnung: 1µl) auf 80 µl aufgefüllt. Das Ausfällen der DNA erfolgte durch Zugabe von 2,5 Vol. (200 µl) eiskaltem, absoluten Ethanol und einem anschließendem Verbleib für 45-60 min bei -70 °C.

Tab. 2.8 Herstellung der Sonden am Beispiel einer mit Nick-Translation markierten *Coincya monensis*- (ComCom-)Sonde mit Raps-(AACC-)*blocking*-DNA. Aufgeführt sind lediglich die variablen Parameter. Erläuterungen im Text.

	<i>C. monensis</i> (ComCom)
c_{DNA} von Wildart	0,15 µg/µl
Wildart-DNA, eingesetzt für Nick-Translation	0,18 µg → 1,2 µl
<i>A. bidest.</i> , auf 18 µl aufgefüllt	4,8 µl
$C_{\text{blocking-DNA}}$ von Raps	0,20 µg/µl
Raps- <i>blocking</i> -DNA (50facher Überschuß)	9,00 µg → 45,0 µl
<i>A. bidest.</i> , auf 80 µl aufgefüllt	1,0 µl

Danach wurden die Reaktionsgefäße mindestens 20 min bei maximaler Geschwindigkeit (16060 x g) in der Mikrokühlzentrifuge 202 MK zentrifugiert (4 °C), der Überstand wurde verworfen. Anschließend folgte eine fünf- bis maximal zehnmünütige Trocknung des Pellets bei 37 °C und die Resuspension in 100 µl Formamid (30-60 min bei 37 °C). Formamid sorgt in Denaturierungs- und Hybridisierungslösungen dafür, daß die Reaktionen bei einer Temperatur stattfinden können, die die Gewebestruktur nicht schädigt. Es beeinflusst darüber hinaus auch die Stringenz. Diese hängt von der Temperatur, der Ionenstärke und der Konzentration helixdestabilisierender Moleküle (z. B. Formamid) ab (LEITCH *et al.* 1994). Die abschließend mit 100 µl 2 x Hybridisierungs-Mastermix (4 x SSC, 20 % Dextransulfat) aufgefüllten Sonden waren bei -20 °C über mehrere Monate haltbar. 4 x SSC wurde aus autoklaviertem 20 x SSC (3 M NaCl, 0,3 M $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 2 \text{H}_2\text{O}$), pH-Wert 7,0) verdünnt. Dextransulfat ist ein inertes Polymer, das die Geschwindigkeit der Hybridisierung verdreifacht (LEITCH *et al.* 1994).

Vorbehandlung der Objektträger

Die zur Hybridisierung bestimmten Objektträger wurden zunächst dreimal bei RT auf einem Schüttler wie folgt vorbehandelt: 5 min in 1 x PBS [angesetzt und autoklaviert: 10 x PBS (1,3 M NaCl, 70 mM Na₂HPO₄, 30 mM NaH₂PO₄), pH-Wert 7,4], dann 10 min in einer nicht autoklavierten Lösung aus 1 x PBS, 50 mM MgCl₂ und 1 % Formaldehyd und abschließend erneut 5 min in 1 x PBS. Hierbei dient das Formaldehyd der Fixierung im Sinne der Quervernetzung der Chromosomenpräparate (in Ergänzung zum anderen Fixativ Ethanol/Eisessig, das zum Ausfällen von Proteinen führt) und bewirkt die Stabilisierung der Chromosomen vor der drastischen Denaturierung (Gefahr des Verlusts von DNA). Dem schloß sich eine Ethanol-Reihe (70 %/90 %/95 %, je 2 min, auf Eis) zur Entwässerung an. Danach wurden die Objektträger mindestens 15 min getrocknet.

Chromosomen-Denaturierung

Zunächst wurden eine Metallplatte und die Denaturierungslösung (2 x SSC, 70 % Formamid) im Wasserbad auf 70 °C erhitzt. Pro Objektträger wurden 180 µl der heißen Denaturierungslösung aufgetragen und mit einem großen Deckglas (24 x 60 mm) abgedeckt. Im Anschluß daran erfolgte auf der erhitzten Metallplatte genau 2 min lang die Denaturierung der Chromosomen. Nach der schnellen Entfernung der Deckgläser wurden die Objektträger sofort in die oben beschriebene Ethanol-Reihe überführt und anschließend erneut mindestens 15 min getrocknet.

GISH s. str.

Die Sonde wurde 10 min bei 75 °C denaturiert, auf Eis abgekühlt (ca. 20 sec) und anschließend bei 37 °C 20 min lang prähybridisiert. Dieser, auch als *pre-annealing* bezeichnete Schritt führt zur Hybridisierung homologer Sequenzen der markierten DNA (z. B. der von *C. monensis*) und der *blocking*-DNA. Lediglich für Bereiche, die für die Art, deren DNA markiert wurde, spezifisch sind, bestehen bei der nunmehr folgenden *in situ*-Hybridisierung noch Bindungsmöglichkeiten. 17 µl der prähybridisierten Sonde wurden dann auf den in Frage kommenden Bereich des Objektträgers mit den bereits denaturierten Chromosomen aufgetragen. Dieser wurde anschließend mit einem 24 x 32 mm-Deckgläschen abgedeckt und mit Fixogum (Marabu, Tamm) abgedichtet. Die Hybridisierung erfolgte bei 37 °C über Nacht in der Feuchtekammer.

Post-Hybridisierungs-Waschschritte

Nach Entfernung der Deckgläschen wurden die über Nacht hybridisierten Präparate drei geeigneten, empirisch ermittelten Waschschritten unterschiedlicher Stringenz (jeweils im Wasserbad bei 42 °C, Schütteln nicht nötig) unterzogen: zunächst 5 min in 2 x SSC (niedrige Stringenz), dann 10 min in 0,2 x SSC (hohe Stringenz) und abschließend erneut 5 min in 2 x SSC. Danach erfolgte ein Transfer der Objektträger in 4 x SSC/0,5 % Tween 20 (Raumtemperatur), wo sie bis zum Beginn der Detektion (Digoxigenin-markierte Sonden) bzw. der DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol)-Färbung (Cy3-markierte Sonden) verblieben (2 min bis einige Tage).

Detektion

Eine Detektion über eine Kaskade von drei verschiedenen Antikörpern, wobei der tertiäre mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC) gekoppelt ist, war nur bei den Präparaten notwendig, die mit Digoxigenin- (im folgenden: Dig-)markierten Sonden hybridisiert

wurden. Der Einsatz dreier aufeinanderfolgender Antikörper diente der Signalverstärkung. Mit Fluorochrome Cy3 markierte Sonden-DNA ließ sich hingegen direkt am Fluoreszenzmikroskop nachweisen; hier war keine Detektion über Antikörper notwendig.

Zur Detektion Dig-markierten Chromatins wurde Anti-Digoxigenin-Fluorescein (Fab-Fragmente; Roche, Mannheim; vom Schaf, Stock: 200 µg/ml, Verdünnung 1:10) als primärer Antikörper verwendet. Hier ist zu erwähnen, daß dieser nicht notwendigerweise bereits Fluorescein-markiert zu sein braucht, da der tertiäre Antikörper auch mit FITC gekoppelt ist. An den Anti-Dig-Antikörper band dann der sekundäre Antikörper: Anti-Sheep IgG (*whole molecule*) [vom Kaninchen; Sigma-Aldrich, Steinheim; Stock: 1 ml (Total-Protein: 10,7 mg), Verdünnung 1:100]. Dieser wurde vom tertiären Antikörper gebunden: Anti-Rabbit IgG (H+L)-Fluorescein [Roche, Mannheim; Stock: 1 mg/ml, Verdünnung: 1:200]. Beim Umgang mit dem letzten Antikörper war aufgrund seiner Kopplung mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC auf Dunkelheit zu achten.

Jeweils 50 µl der jeweiligen Gebrauchslösung der drei Antikörper wurden pro Objektträger aufgetragen, mit *plastic coverslips* (deckgläschengroße, aus autoklavierbaren Beuteln geschnittene Stücke) abgedeckt und 15 min bei 37 °C in der Feuchtekammer inkubiert. Nach der Inkubationszeit für jeden Antikörper wurden die Präparate dreimal je 2 min in 4 x SSC/0,5 % Tween 20 bei RT auf dem Schüttler zur Entfernung ungebundener Antikörper gewaschen.

Die Gegenfärbung erfolgte, bei Dig- und Cy3-markierten Präparaten gleichartig, durch ein Aufbringen von 100 µl DAPI (2 µg/ml), das 1-2 min auf dem Objektträger verblieb. Diese Substanz wurde dann vorsichtig unter Leitungswasser abgespült. Die Zugabe von 30 µl des *Antifades* 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan (DABCO) - Gebrauchslösung: 90 % (v/v) Glycerin (für Fluoreszenzmikroskopie; Merck, Darmstadt) in 1 x PBS + 10 % (w/v) DABCO (Sigma-Aldrich, Steinheim), KOBELT (2001) - diente dazu, ein vorzeitiges Ausbleichen der Präparate zu verhindern. Abschließend erfolgte das Abdecken mit Hilfe eines Deckgläschens (24 x 32 mm) und ein kurzes, leichtes Quetschen unter Zuhilfenahme von Filterpapier.

Tab. 2.9 Verwendete Fluorochrome mit Anregungs- und Emissionswellenlängen (in nm, nach SCHWARZACHER & HESLOP-HARRISON 2000).

Fluorochrom	Mittlere Anregungs- wellenlänge	Mittlere Emissions- wellenlänge	Farbe der Fluoreszenz
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	358	461	blau
Fluoresceinisothiocyanat (FITC)	495	523	grün
Cyanin 3 (Cy3)	550	570	rot

Die nunmehr mikroskopierfertigen Präparate konnten noch zwei bis drei Tage ohne Qualitätsverlust im Dunkeln bei RT aufbewahrt werden. Zur Auswertung und fotografischen Erfassung standen die Fluoreszenzmikroskope Leitz Dialux 20 (Leitz, Wetzlar; in Verbindung mit dem automatischen Mikrofotosystem Leica Wild MPS 48/52 und dem Diafilm Kodak Ektachrome 400 ASA) und Leitz DMRX (Leitz, Wetzlar) mit jeweils unterschiedlichen Filterblöcken für die verschiedenen Fluorochrome (Tab. 2.9 & 2.10) zur Verfügung. Quecksilberdampf-Kurzbogenlampen HBO (Osram) dienten als Fluoreszenzlampen. Am Mikroskop Leitz DMRX

konnten digitale Aufnahmen gemacht werden (Schwarz-Weiß-Kamera und Software wie in Kap. 2.2.4.1). Entwickelte Diafilme mit am Fluoreszenzmikroskop Leitz Dialux 20 entstandenen Aufnahmen wurden mit dem Diascanner CoolScan Ls 30 (Nikon, Japan) digitalisiert. Die weitere Aufbereitung dieses Filmmaterials erfolgte mit den Bildbearbeitungsprogrammen Adobe® Photoshop® (Version 5.0 LE; Adobe, San Jose/USA) bzw. Image-Pro® Plus (Kap. 2.2.4.1).

Pro Hybridisierung wurden mindestens zehn Metaphasen ausgezählt und auch Interphasen beachtet.

Tab. 2.10 Filterblöcke für die jeweiligen Fluorochrome an den Mikroskopen Leitz Dialux 20 und Leitz DMRX. BP = Bandpaßfilter, RKP = Reflexions-Kurzpaßfilter, LP = Langpaßfilter (Wellenlänge in nm).

Mikroskop	Filterblock	Anregungs- bereich	Anregungs- filter	Teilerspiegel	Sperrfilter	Fluorochrom
Dialux 20	A	Ultraviolett	BP 340-380	RKP 400	LP 430	DAPI
	I 2	Blau	BP 450-490	RKP 510	LP 515	FITC
	N 2.1	Grün	BP 515-560	RKP 580	LP 580	Cy3
DMRX	A (513804)	Ultraviolett	BP 340-380	RKP 400	LP 425	DAPI
	I 3 (513808)	Blau	BP 450-490	RKP 510	LP 515	FITC
	Y 3 (513837)	Cy3-Grün	BP 545/30	RKP 565	BP 610/75	Cy3

An den Mikroskopen standen die nachfolgenden Optiken (alle bezogen von Leica, Wetzlar) zur Verfügung. Bei den Objektiven entspricht die Angabe vor dem Schrägstrich der Vergrößerung, die danach der optischen Apertur.

Leitz Dialux 20

Objektive: Phaco 1 10/0,30

Okular: Periplan GF 12,5 x/18 M

NPL Fluotar 25/0,55

Phaco 2 40/0,65

PL Fluotar 50/1,00 Oil

PL Fluotar 100/1,32 Oil

Leitz DMRX

Objektive: PL Fluotar 5 x/0,12

Okular: L Plan 10 x/25 M

PL Fluotar 10 x/0,30

PL Fluotar 20 x/0,50

PL APO 20 x/0,60

PL APO 40 x/0,75

PL Fluotar 40 x/1,00 - 0,50 Oil

PL APO 100 x/1,40 - 0,70 Oil

2.2.4.4 Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH)

Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) ist - strenggenommen - ein Überbegriff, der auch die Genomische *in situ*-Hybridisierung (GISH) umfaßt. Nachfolgend soll FISH jedoch im Hinblick auf den Einsatz nicht-genomischer Sonden separat betrachtet werden.

Für die FISH-Untersuchungen wurde der rDNA-Plasmid-Klon VER 17 (6 kb pBR 325; mit 3,7 kb großem 45S rDNA-Insert aus *Vicia faba*; enthält 5,8S, 18S und Teile der 25S rDNA; YAKURA & TANIFUJI 1983; von I. Schubert/IPK zur Verfügung gestellt) eingesetzt.

Die Durchführung der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung weicht nur in wenigen Punkten von der im Kapitel 2.2.4.3 ausführlich dargelegten GISH-Methode ab. So wurden jeweils 0,8 µg DNA der rDNA-Plasmid-Klone zur Nick-Translation eingesetzt. Als *blocking*-DNA diente autoklavierte Lachssperma-DNA in 50-200fachem Überschuß.

In einigen Fällen erfolgten *in situ*-Hybridisierungen, bei denen gleichzeitig zwei unterschiedlich markierte Sonden eingesetzt wurden, z. B. eine DIG-markierte genomische Sonde und eine Cy3-markierte rDNA-Sonde. Hier wurde so verfahren, wie im Kapitel 2.2.4.3 beschrieben, mit der einen Ausnahme, daß mit der doppelten Gesamtsondenmenge (2 x 17 µl gleichzeitig auf einem Objektträger) hybridisiert wurde. Die mikroskopische Auswertung und fotografische Erfassung erfolgte dann in drei aufeinanderfolgenden Schritten:

1. DAPI-Filter (Gegenfärbung)
2. FITC-Filter (DIG-Markierung)
3. Cy3-Filter (Cy3-Markierung)

2.2.5 Analyse mittels molekularer Marker – Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

2.2.5.1 Isolierung von DNA

2.2.5.1.1 CTAB-Methode (Maxipräparation)

Die Isolierung größerer Mengen genomischer DNA erfolgte nach einer Methode von ROGERS & BENDICH (1985). Nukleinsäuren bilden mit Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) bei höheren Salzkonzentrationen (0,7 M NaCl) stabile lösliche Komplexe. Durch Reduzierung der Salzkonzentration auf unter 0,4 M präzipitiert der CTAB/Nukleinsäure-Komplex, während die Polysaccharide in Lösung bleiben.

2 g Blattmaterial wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und zu feinem Pulver gemörsert. Das Pulver wurde in vorgekühlte Polyallomerzentrifugenröhrchen gegeben, mit 5 ml des auf 65 °C vorgewärmten 2 x CTAB-Puffers [2 % CTAB (w/v), 1,4 M NaCl, 100 mM TRIS/HCl (pH-Wert 8,0), 20 mM Na₂EDTA] gemischt und 20 min bei 65 °C inkubiert. Nach ca. zehnminütigem Abkühlen wurde die Probe mit 1 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) gründlich gemischt und 10 min bei 5640 x g und RT zentrifugiert [Kühlzentrifuge J2-MC (Beckman, Palo Alto/USA)]. Die obere Phase wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und mit 0,2 Vol. des vorher auf 65 °C erwärmten 5 x CTAB-Puffers [5 % CTAB (w/v), 350 mM NaCl] versetzt. Nach 10 min Inkubation bei 65 °C wurde die Probe erneut mit 1 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) gemischt und anschließend 10 min bei 5640 x g und RT zentrifugiert. Danach wurde die klare, obere Phase abgenommen, in ein Corexröhrchen überführt, mit 1-2 Vol. Präzipitationspuffer [1 % CTAB (w/v), 50 mM TRIS/HCl (pH-Wert 8,0), 10 mM Na₂EDTA] gemischt und über Nacht bei RT stehengelassen, damit der CTAB-Nukleinsäure-Komplex ausfällt.

Am nächsten Tag wurde die Probe erneut 10 min bei 5640 x g und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 2 ml HS-TE [10 mM TRIS/HCl (pH-Wert 8,0),

1 mM Na₂EDTA, 1 M NaCl] aufgenommen und zum schnelleren Lösen der CTAB-DNA-Komplexe ca. 10 min bei 65 °C inkubiert. Danach wurden 2 Vol. eiskaltes absolutes Ethanol hinzugegeben und die Nukleinsäuren 30 min bei -70 °C gefällt. Nach zehnmütiger Zentrifugation (5640 x g) bei 4 °C erfolgte das Lösen des Pellets in 300 µl *A. bidest.* Die Lösung wurde in ein 2-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, mit 300 µl 5 M Ammoniumacetat (pH-Wert 7,5) versetzt (Ausfällen der RNA) und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Probe 10 min bei 16060 x g (Mikrokühlzentrifuge 202 MK; Sigma, Osterode/Harz) und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 2 Vol. kaltem absoluten Ethanol gemischt. Es folgte eine 30minütige Inkubation bei -70 °C. Nach abschließendem Zentrifugieren (10 min bei 16060 x g und 4 °C) wurde das Pellet bei RT getrocknet, in 100 µl TE-Puffer (10 mM TRIS, 1 mM Na₂EDTA; pH-Wert 8,0) aufgenommen und über Nacht bei 4 °C gelöst.

Der DNA-Gehalt der Proben wurde zunächst anhand von Messungen mit einem Spektralphotometer [6405 UV/VIS Spectrophotometer (Jenway, Essex/England)] bestimmt. Hierzu wurde die optische Dichte (OD) bei den Wellenlängen $\lambda = 260$ nm und $\lambda = 280$ nm gemessen. Bei $\lambda = 260$ nm entspricht ein Absorptionswert von 1 bei einer Schichtdicke von 1 cm einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Der Quotient OD₂₆₀/OD₂₈₀ gibt Aufschluß über die Reinheit der Nukleinsäure. Bei reiner DNA liegt er bei 1,8-2,0. Niedrigere Werte lassen auf eine Verunreinigung durch Proteine oder Phenole schließen. Der DNA-Gehalt der Proben wurde mit Hilfe der folgenden Formel berechnet:

$$\text{OD}_{260} \times 50 \text{ µg/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor} = \text{µg DNA/ml.}$$

Da im Spektralphotometer bei der Ermittlung des DNA-Gehaltes RNA und andere Verunreinigungen mitgemessen werden, wurden nach der Messung pro Probe 2 µg DNA auf ein Agarosegel (0,8 %, w/v) gegen eine λ -DNA-Konzentrationsreihe (200, 400, 600, 800, 1000, 2000 ng) aufgetragen. RNA und nicht intakte DNA sind nach der Auftrennung als Schmier erkennbar. Intakte DNA ist hingegen durch deutliche Banden charakterisiert. Durch den Vergleich der Bandenstärke konnte der DNA-Gehalt der Probe abgeschätzt werden.

Aufgrund des Ausfalls des Spektralphotometers wurde im späteren Stadium der Arbeiten der DNA-Gehalt nur durch den Bandenvergleich auf dem Gel ermittelt. Hierzu wurden jeweils 2 µl der DNA-Lösung eingesetzt. Bei nicht eindeutigen Ergebnissen, z. B. bei sehr hohen DNA-Konzentrationen, erfolgte eine zweite Abschätzung anhand einer λ -DNA-Konzentrationsreihe.

2.2.5.1.2 EDWARDS-Methode (Minipräparation)

In einigen Fällen wurde DNA nach einem modifizierten Protokoll von EDWARDS *et al.* (1991) isoliert. Es handelt sich hierbei um eine schnell durchführbare Methode, bei der kleinere DNA-Mengen gewonnen werden, deren Reinheitsgrad für die PCR, z. B. mit RAPD-Primern, ausreichend ist.

Eine Probe frisches Blattmaterial (ausgestanzt mit dem Deckel eines 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßes) wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben, mit 400 µl Extraktionspuffer [200 mM TRIS-Base, 250 mM NaCl, 25 mM Na₂EDTA, 0,5 % (w/v) SDS, pH-Wert 7,5] versetzt und mit einem Teflonpistill (Eppendorf Micropistille Nr. 0030 120.973) möglichst kurz gemörsert, bis die Probe homogenisiert war. Anschließend wurde die Probe 2 min

bei 16060 x g und RT zentrifugiert (Mikrokühlzentrifuge 202 MK; Sigma, Osterode/Harz). 300 µl des Überstandes wurden in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, mit 300 µl kaltem Isopropanol gemischt und anschließend mindestens 2 min bei RT inkubiert, um die DNA zu fällen. Diese wurde dann pelletiert, indem 7 min bei 16060 x g und 4 °C zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet einmal mit 70 %igem kaltem Ethanol gewaschen, getrocknet und dann in 100 µl TE-Puffer (siehe 2.2.5.1.1) über Nacht im Kühlschrank gelöst. Für die PCR wurden jeweils 2,5 µl dieser Lösung eingesetzt. Eine vorherige Bestimmung der DNA-Konzentration, wie unter 2.2.5.1.1 beschrieben, erfolgte hier nicht.

2.2.5.2 *Bulk segregant analysis*

Unter *bulk segregant analysis* (auch: *bulked segregants analysis* bzw. *bulked segregant analysis*) versteht man die Zusammenfassung und vergleichende Analyse phänotypisch ähnlicher Proben, um Marker zu gewinnen, die mit bestimmten Eigenschaften, z. B. Resistenzen, gekoppelt sind (MICHELMORE *et al.* 1991).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei derartige Analysen mit RAPD-Primern durchgeführt. Von jeweils acht bis zwölf gegenüber dem Isolat W4 bzw. dem Isolat M1 von *Leptosphaeria maculans* adultresistenten (Boniturnoten < 2) und adultanfälligen (Boniturnoten ≥ 4) Nachkommen einer spaltenden Generation (Selbstungs- oder Rückkreuzungsnachkommen) wurde DNA mit Hilfe der CTAB-Methode (Kap. 2.5.1.1.1) gewonnen. Für das RAPD-Primer-Screening wurde sowohl die DNA der anfälligen als auch die der resistenten Pflanzen gepoolt. Pro Pflanze wurden 500 ng DNA eingesetzt. Die Untersuchungen betrafen Genotypen der *B. napus*-*C. monensis*-Linien (zwei Selbstungsnachkommenschaften) und eine Selbstungsnachkommenschaft eines Rückkreuzungsnachkommens der Kreuzung *B. napus* x *S. arvensis*. Sie sind in Tabelle 2.11 zusammengefaßt.

2.2.5.3 RAPD-PCR

Die PCR wurde modifiziert nach WILLIAMS *et al.* (1990) durchgeführt. Bei der Mehrzahl der Untersuchungen war der Reaktionsansatz (25 µl) wie folgt zusammengesetzt:

- 2,5 µl 10 x *Incubation Mix* [1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM TRIS/HCl (pH-Wert 8,0), 0,02 % (w/v) Gelatine, 0,1 % (v/v) Triton X-100; Qbiogene, Heidelberg]
- 2,5 µl 2 mM dNTP-Mix (Qbiogene, Heidelberg)
- 1,5 µl 50 mM MgAc₂
- 1 µl „CTAB-DNA“ (10 ng) bzw. 2,5 µl „EDWARDS-DNA“
- 3 µl Primer (Roth, Karlsruhe)
- 0,2 µl Taq-Polymerase (5 U/µl, Qbiogene, Heidelberg)
- 14,3 µl *A. bidest.* (bzw. 12,8 µl bei Verwendung von „EDWARDS-DNA“).

Die Ansätze wurden mit 35 µl sterilem Paraffinöl überschichtet.

Tab. 2.11 *Bulk segregant analysis* in drei spaltenden Selbstungsnachkommenschaften. Gezeigt werden die Chromosomenzahlen der jeweiligen Ausgangspflanzen der Selbstungen, die nach Tests mit Doppelinkulation adultanfälligen und -resistenten Pflanzen gegenüber dem Isolat W4 von *L. maculans*, die zu Pools vereinigt wurden, sowie die getesteten RAPD-Primer (Operon Technologies). Tiefgestellte römische Zahlen = Versuch, dem die Pflanzen entstammen. R_A = Adultresistenz, S_A = Adultanfälligkeit.

Ausgangspflanze	<i>B. napus-C. monensis</i> -Linien		<i>B. napus-S. arvensis</i> -Linien
	BC ₂ S ₁ * 16/1-3	BC ₂ S ₄ * 16/1-3-27.18.1	BC ₃ S ₂ 13.6-11.9
Chromosomenzahl der Ausgangspflanze (2n)	44	38	38
Isolat	W4	W4	W4
RAPD-Primer	4 Kits à 20 Primer: OPE-1-20, OPF-1-20, OPH-1-20, OPI-1-20	OPE-1-6, 8-20; OPF-1-20; OPH-1-11, 13-20; OPAT-7; OPAV-2, 4, 5; OPAW-17; OPAY-7; OPG-2, 4, 11; OPK-8; OPL-4, 6, 12; OPM-18; OPN-5, 9, 16; OPQ-12; OPS-19, 20; OPV-16; OPW-9, 13; OPX-1; OPY-4	wie bei Nachkommenschaft der BC ₂ S ₄ * 16/1-3-27.18.1
Resistente Pflanzen für Pool R_A	1 _{IV}	2 _{EV}	3 _{EV}
	2 _{IV}	8 _{EV}	7 _{EV}
	8 _{IV}	9 _{EV}	8 _{EV}
	12 _{IV}	13 _{EV}	12 _{EV}
	2 _{VII}	17 _{EV}	13 _{EV}
	5 _{VII}	25 _{EV}	9 _{VII}
	20 _{VII}	27 _{EV}	14 _{VII}
	4 _{VI}	30 _{EV}	-
	10 _{VI}	9 _{VII}	-
	14 _{VI}	19 _{VII}	-
15 _{VI}	-	-	
17 _{VI}	-	-	
Anfäll. Pflanzen für Pool S_A	5 _{IV}	4 _{EV}	14 _{EV}
	2 _{VI}	18 _{EV}	18 _{EV}
	13 _{VI}	20 _{EV}	20 _{EV}
	18 _{VI}	-	-
	25 _{VI}	-	-
	9 _{VII}	-	-
	35 _{VII}	-	-
	9 _{PCK}	-	-

Die Amplifikation der DNA erfolgte in einem DNA-Thermocycler (DNA Thermal Cycler, Perkin Elmer, Überlingen) unter folgenden Bedingungen:

1. 4 min 94 °C
2. 45 Zyklen mit 20 sec bei 93 °C, 1 min bei 36 °C und 20 sec bei 72 °C
3. 6 min 72 °C
4. 10 °C bis zur Entnahme der Proben aus dem Thermocycler

Im Zusammenhang mit der *bulk segregant analysis* (Abschnitt 2.2.5.2, Tab. 2.11) wurde neben den Pool-DNAs auch die DNA anfälliger und resistenter Elternpflanzen untersucht. Gab es bei bestimmten Primern Hinweise auf Differentialbanden zwischen den Pools, so erfolgten Wiederholungen dieser Analysen. Abschließend wurde die DNA der resistenten und anfälligen Pflanzen auch auf Einzelpflanzenebene getestet. Die an den drei Nachkommenschaften untersuchten RAPD-Primer sind ebenfalls Tabelle 2.11 zu entnehmen.

2.2.5.4 Gelelektrophorese

Die Auftrennung von PCR-Produkten und genomischer DNA (zur Konzentrationsbestimmung) erfolgte mittels horizontaler Gelelektrophorese in Gelkammern der Marke OWL (Angewandte Gentechnologie Systeme GmbH, Heidelberg). Es wurden Gele mit verschiedener Agarosekonzentration [je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente; PCR-Produkte: 1,5 % (w/v), genomische DNA: 0,8 % (w/v)] verwendet. Als Puffer diente 1 x TBE (Stammlösung 5 x TBE, für 1 l: 54 g TRIS, 27,5 g Borsäure, 20 ml 0,5 M EDTA-Lösung, pH-Wert 8,0). Zur späteren Anfärbung der DNA wurde Ethidiumbromid [1 %ige (w/v) wäßrige Lösung] direkt ins Gel gegeben (Endkonzentration ca. 0,05 µl/ml). Ethidiumbromid interkaliert in die DNA indem es sich zwischen benachbarte Basen schiebt. So kann es UV-Strahlung absorbieren und diese Energie als Fluoreszenz wieder freisetzen. Die DNA-Proben wurden mit 1/5 Volumen 6 x Ladepuffer (0,09 % Bromphenolblau, 0,09 % Xylencyanol FF, 60 % Glycerin, 60 mM EDTA) gemischt und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Als Größenmarker dienten - in unterschiedlicher Kombination - λ-DNA (0,3 µg/ml, geschnitten mit den Restriktionsenzymen *EcoR* I und *Hind* III), GeneRuler™ 100 bp Ladder Plus bzw. GeneRuler™ 1 kb Ladder (alle von MBI Fermentas, St. Leon-Rot). Die Elektrophorese erfolgte entweder tagsüber bei ca. 3,2 V/cm (ca. 80 Volt, ca. 5 h) oder über Nacht bei ca. 1,5 V/cm (25-40 Volt). Die Banden im Gel wurden auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und mittels einer Gel-Dokumentationsanlage fotografisch festgehalten.

2.2.6 Sonstiges

Neben den bisher beschriebenen Untersuchungen wurden weitere Merkmale der jeweiligen Rückkreuzungsnachkommenschaften in die Auswertungen der Versuche miteinbezogen. Dies betraf vor allem morphologische und physiologische Besonderheiten der Pflanzen, wie den Habitus (intermediär zwischen Eltern oder rapsartig, eventuell besonders klein, Umwelteinfluß auf Größe), Blattverfärbungen und Panaschierungen, das Blühverhalten und Anomalien bei der Samenkeimung (bald absterbende Albino-Pflanzen, schlechte Keimungsrate, verzögerte Keimung durch Keimruhe). Auf derartige Merkmale wird in der Regel bei der Besprechung der Resistenztests und im Tabellenanhang eingegangen.