



Hochschule Anhalt

Anhalt University of Applied Sciences

**Beeinflussung der Anzahl und Verteilung
meiotischer Rekombinationsereignisse in der Gerste
(*Hordeum vulgare*) mittels Manipulation
epigenetischer Faktoren anhand von Chemikalien**

**Bachelorarbeit
zur Erlangung des akademischen Grades
Bachelor of science (B.sc.)**

Judith Kappermann

Mat. Nr. 4059923

Studiengang: Biotechnologie

- 1. Gutachter: Prof. Dr. Gotthard Kunze**
- 2. Gutachter: Dr. Martin Giersberg**

Datum der Abgabe: 29.09.2017

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Meiotische Rekombination	1
1.2	Lokalisation der meiotischen Rekombination	6
1.3	Meiotische Rekombination in Gerste.....	7
1.4	Beeinflussung der meiotischen Rekombination.....	10
1.5	DNA-Methylierung	12
1.6	Messung der meiotischen Rekombination.....	14
1.7	Zielstellung	16
2	Methoden.....	17
2.1	Pflanzenwachstum	17
2.2	Behandlung der Gerste mit EdU.....	17
2.3	Behandlung der Gerste mit Zebularin und 5-Azacytidin	19
2.4	Herstellung von Objektträgern mit Gerstenantheren für zytologische Studien	20
2.5	EdU Detektion	21
2.6	Genotypisierung mittels allelspezifischer quantitativer PCR	21
2.6.1	Design von Primern und Sonden	21
2.6.2	Validierung der quantitativen Echtzeit-PCR	22
2.6.3	Sortieren von individuellen Blatt- und Pollenkernen mittels Durchflusszytometrie	26
3	Ergebnisse.....	27
3.1	Behandlung mit EdU.....	27
3.2	Behandlung mit Zebularin und 5-Azacytidin	32
3.3	Validierung der quantitativen Echtzeit-PCR	39
4	Diskussion.....	47
4.1	Entwicklung einer Methode zum <i>in planta</i> Injizieren gelöster Chemikalien in Ähren der Gerste	47
4.2	Entwicklung der Pollengenotypisierung.....	50
4.3	Einfluss von DNA-Methylierungsinhibitoren	50
5	Zusammenfassung und Ausblick	52
6	Literaturverzeichnis.....	54
7	Abbildungsverzeichnis.....	62
8	Tabellenverzeichnis	63
9	Anhang.....	65
	Eidesstattliche Erklärung.....	67

1 Einleitung

1.1 Meiotische Rekombination

Die Meiose ist die Grundlage für die geschlechtliche Fortpflanzung und genetische Variabilität in Eukaryoten. Sie beinhaltet eine DNA-Replikation gefolgt von zwei Zellteilungen, wodurch aus einer Zelle vier haploide Zellen entstehen, aus denen die Gameten hervorgehen (Abbildung 1). In Pflanzen findet die männliche Meiose in den Antheren und die weibliche im Gynöceum statt. In der Mehrzahl der Pflanzen bilden alle vier haploiden Produkte einer männlichen Meiose reife Pollenkörner aus, wohingegen drei der vier Produkte einer weiblichen Meiose den programmierten Zelltod erfahren. Die verbleibende Zelle entwickelt sich dann zum weiblichen Gametophyt, dem Embryonensack (Osman et al. 2011). Die Anzahl der Chromosomen wird in zwei Schritten in der Meiose halbiert. In der Meiose I werden die homologen Chromosomen getrennt, wobei in den meisten Spezies eine physische Verbindung der homologen Chromosomen, durch mindestens ein Crossover pro Bivalent, für die korrekte Aufteilung der Chromosomen notwendig ist (Jones und Franklin 2006). Die Schwesterchromatiden werden in der Meiose II getrennt (Lambing et al. 2017). Eine strikt kontrollierte Abfolge von DNA-Replikation und zwei aufeinander folgenden Teilungen ist notwendig, um eine Replikation der DNA zwischen den beiden Teilungen der Meiose zu verhindern (Mercier et al. 2015). Während der Meiose kommt es zur homologen Rekombination (Lambing et al. 2017), welche für die genetische Diversität essentiell ist. Sie ist der Antrieb der Evolution, aber ist ebenso Grundlage für den Fortschritt der Züchtung. Ein besseres Verständnis des Prozesses der meiotischen Rekombination eröffnet die Möglichkeit, die Rekombination zu manipulieren, um Schnelligkeit und Präzision in Züchtungsprogrammen zu verbessern (Colas et al. 2016).

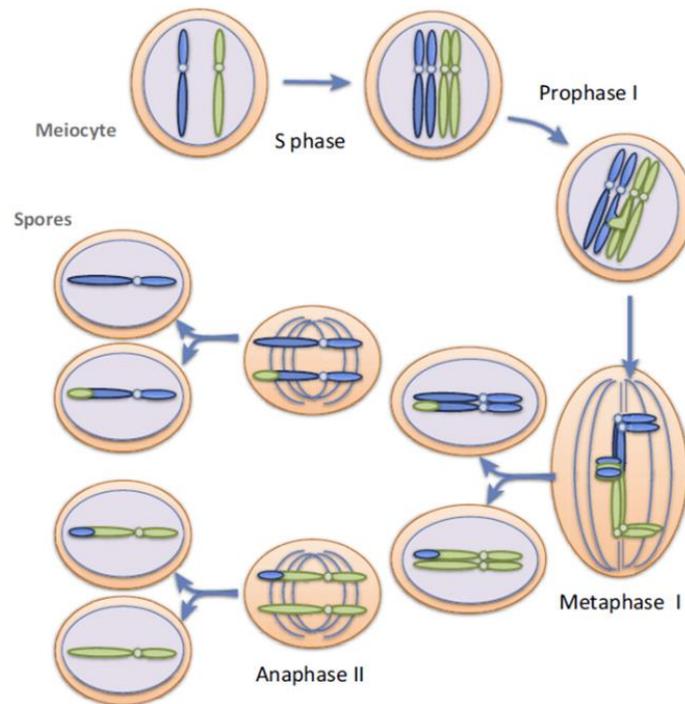


Abbildung 1: Überblick des Ablaufes der Meiose (Mézard et al. 2015). Homologe Chromosomen wurden in grün oder blau dargestellt.

Die meiotische Rekombination wird durch die programmierte Ausbildung von DNA-Doppelstrangbrüchen durch einen das Protein SPO11 enthaltenen Komplex initiiert. Dieser Komplex kommt in allen Eukaryoten vor und ähnelt dem archaealen Topoisomerase-VI-Komplex (Bergerat et al. 1997). DNA-Doppelstrangbrüche sind grundsätzlich gefährlich für die Zelle. Deshalb werden die Ausbildung und Verteilung meiotischer DNA-Doppelstrangbrüche stark reguliert hinsichtlich Zeitpunkt und Ort der Entstehung. Die Verteilung von DNA-Doppelstrangbrüchen ist nicht homogen entlang der meiotischen Chromosomen. Auf molekularer Ebene sind DNA-Doppelstrangbrüche meist in Regionen von Genen bzw. Genpromotoren gehäuft, dies sind die sogenannten Hotspots (Pan et al. 2011). Nach der Initiierung eines DNA-Doppelstrangbruchs bindet SPO11 kovalent über eine Phosphatdiesterbindung an die 5'-Enden der Bruchstellen. SPO11 ist entfernt, wenn die DNA-Enden durch den MRE11-Komplex geschnitten werden, wodurch 3'-Einzelstrang-DNA entsteht (Daoudal-Cotterell et al. 2002; Nicolette et al. 2010). Diese 3'-Einzelstrang-DNA haben eine Länge von etwa ein bis zwei Kilobasen. Sie verbinden sich mit den RecA homologen Rekombinasen DMC1 und RAD51, um nach einer homologen Sequenz für die Reparatur zu suchen (Shinohara et al. 1997; Da Ines et al. 2012). Dieser Komplex ist verantwortlich für das Einfädeln des zu reparierenden Strangs in den Doppelstrang einer anderen Chromatide, welches entweder die Schwesterchromatide oder bevorzugt eine von dem homologen Chromosom sein kann. Durch das Einfädeln und die Basenpaarung mit dem homologen Chromatid entsteht ein sogenannter displacement Loop (D-Loop). Wurde der Strang in die Schwesterchromatide eingefädelt wird das 3'-Ende der 3'-Einzelstrang-DNA verlängert. Danach wird die D-Loop Struktur wieder

aufgelöst. Das instabile Zwischenprodukt, der D-Loop mit einem Chromatid des homologen Chromosoms, kann sich unterschiedlich entwickeln. Es kann durch syntheseabhängiges Strang-Annealing (SDSA) in ein Nicht-Crossover aufgelöst werden. Alternativ kann der D-Loop durch Proteine des ZMM (Zip, Mer, Msh)-Wegs stabilisiert werden. Dabei wird Einzelstrang-DNA am 3'-Ende durch DNA Synthese unter Verwendung des komplementären Strangs des homologen Chromosoms als Template verlängert. Das zweite Ende des DNA-Doppelstrangbruchs kann sich mit dem bewegten Strang des D-Loops binden. Dies resultiert in der sogenannten doppelten Holliday Verbindung, aus der ein Crossover oder ein Nicht-Crossover entstehen kann (Schwacha und Kleckner 1995). Ein Crossover beschreibt den reziproken, genetischen Austausch zwischen homologen Nicht-Schwesterchromatiden. Bei einem Nicht-Crossover wird nur eins der homologen Nicht-Schwesterchromatiden verändert. Crossover sind physische Verbindungen zwischen homologen Chromosomen, welche zytologisch als Chiasmata zu erkennen sind. Dies ist in den meiotischen Stadien Diakinese und Metaphase I möglich, da die Chromosomen in diesen Stadien zytologisch als kondensierte bivalente Strukturen zu erkennen sind. (Colas et al. 2016; Lambing et al. 2017; Mercier et al. 2015; Osman et al. 2011; Yelina et al. 2015). Die von der Formation der doppelten Holliday Verbindung abhängigen Crossover sind Klasse I Crossover, die durch die MutL-Homologen MLH1 und MLH3 entstehen (Ranjha et al. 2014; Rogacheva et al. 2014). Klasse I Crossover zeigen physische Interferenz, wodurch nah beieinanderliegende Klasse I Crossover auf demselben Chromatid verhindert werden. Die Interferenz wirkt sich bei einer Vielzahl von Spezies, wie zum Beispiel in *Chorthippus brunneus*, über eine Distanz von 25 % bis 30 % aus, bevor es langsam reduziert wird über die nächsten 30 % (Jones 1984). Die Entstehung von Klasse I Crossover ist abhängig von einer Gruppe von ZMM-Proteinen. Etwa 80 % bis 90 % der Crossover entstehen in *Arabidopsis* durch den Klasse I Prozess (Higgins et al. 2004; Higgins et al. 2008; Mercier et al. 2005). Die Klasse II Crossover sind unabhängig von der physischen Interferenz von nebeneinander liegenden Crossover. Etwa 10 % bis 20 % der Gesamtanzahl an Crossover zählen zu den Klasse II Crossover. Für die Entstehung von Klasse II Crossover ist das Protein MUS81 notwendig (Higgins et al. 2008; Mercier et al. 2005; Berchowitz et al. 2007; Abbildung 2).

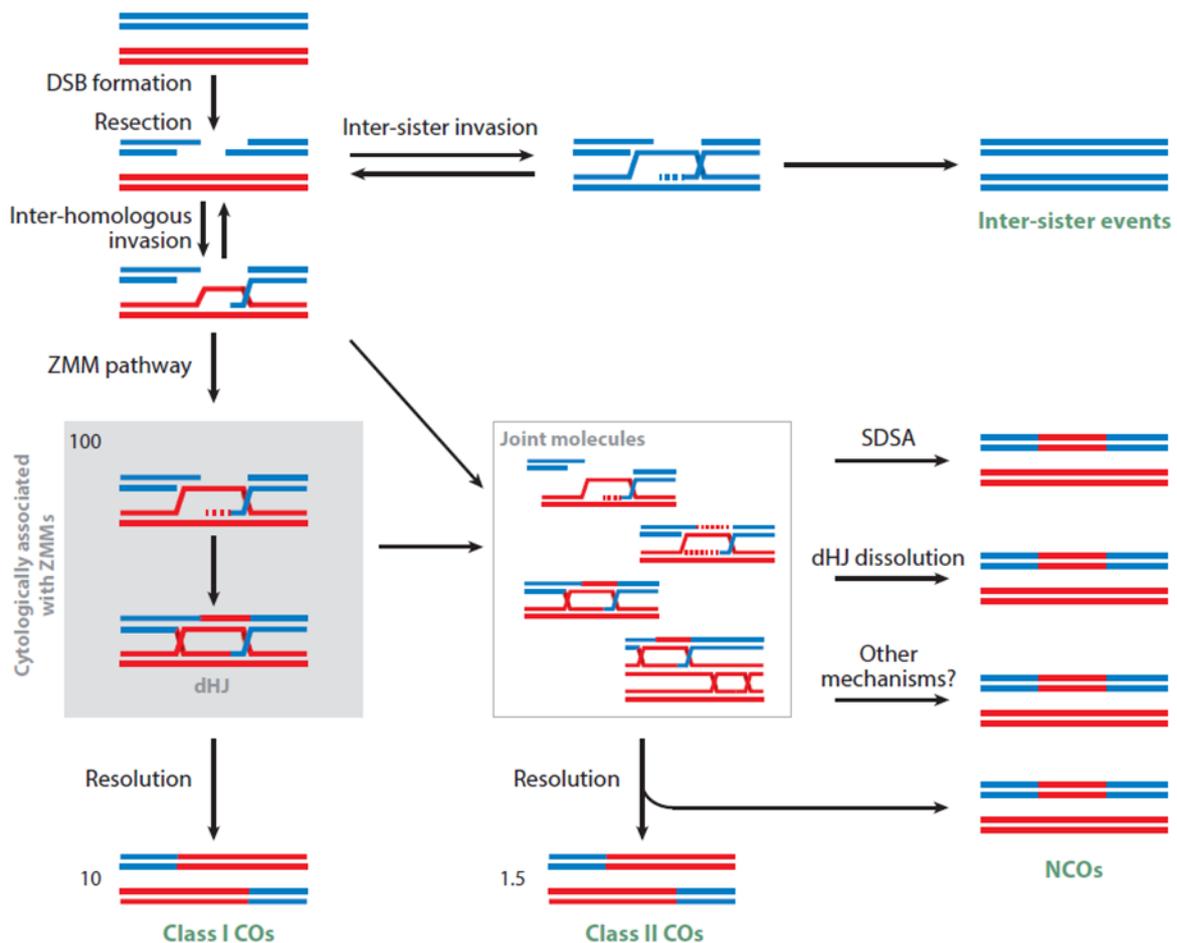


Abbildung 2: Modell der Mechanismen der meiotischen Rekombination, welche durch die Formation von DNA-Doppelstrangbrüchen induziert wird (Mercier et al. 2015)

In der ersten Unterphase der Prophase I, dem Leptotän, wird die Chromosomenachse entlang jedes homologen Chromosoms ausgebildet. Es werden Schwesterchromatiden in linearen Schleifenmustern organisiert, wobei das Chromatin an den Basen der Schleifen über die Proteinachse verbunden ist. In diesem Stadium werden die DNA-Doppelstrangbrüche initiiert. Proteine der Achse, wie zum Beispiel Hop1-Red1 in Sprosshefe und die korrespondierenden Proteine ASY1-ASY3 in *Arabidopsis* und PAIR2-PAIR3 in Reis haben Einfluss bei der Wahl des Templatestrangs für die Reparatur der DNA-Doppelstrangbrüche (Caryl et al. 2000; Ferdous et al. 2012; Hollingsworth und Byers 1989; Nonomura et al. 2006; Thompson und Roeder 1989; Wang et al. 2011). Von Leptotän zu Zygotän werden die Homologenpaare zunehmend angeordnet. Während des Zygotäns beginnt die Synapsis der homologen Chromosomen und es bildet sich der synaptenomale Komplex aus (Page und Hawley 2004), welcher im Pachytän vervollständigt ist. Die Rekombination läuft während der Prophase I ab. Wenn die homologen Chromosomen rekombiniert haben, um Crossover auszubilden, löst sich der synaptenomale Komplex während des Diplotäns auf. In der Diakinese sind die homologen Chromosomen zytologisch sichtbar als kondensierte bivalente Strukturen, die im Normalfall über ein oder mehrere Chiasmata verbunden sind. In der Metaphase I sind die Bivalente

auf der Äquatorialebene angeordnet. Die homologen Chromosomen werden in der Anaphase I getrennt. In der Telophase I und bilden sich zwei Kerne aus und in der Prophase II dekondensieren die Chromosomen für kurze Zeit. In der Metaphase II werden die Chromosomen wieder auf der Äquatorialebene angeordnet, woraufhin die Trennung der Schwesterchromatiden in der Anaphase II erfolgt (Higgins et al. 2014; Mercier et al. 2015; Abbildung 3).

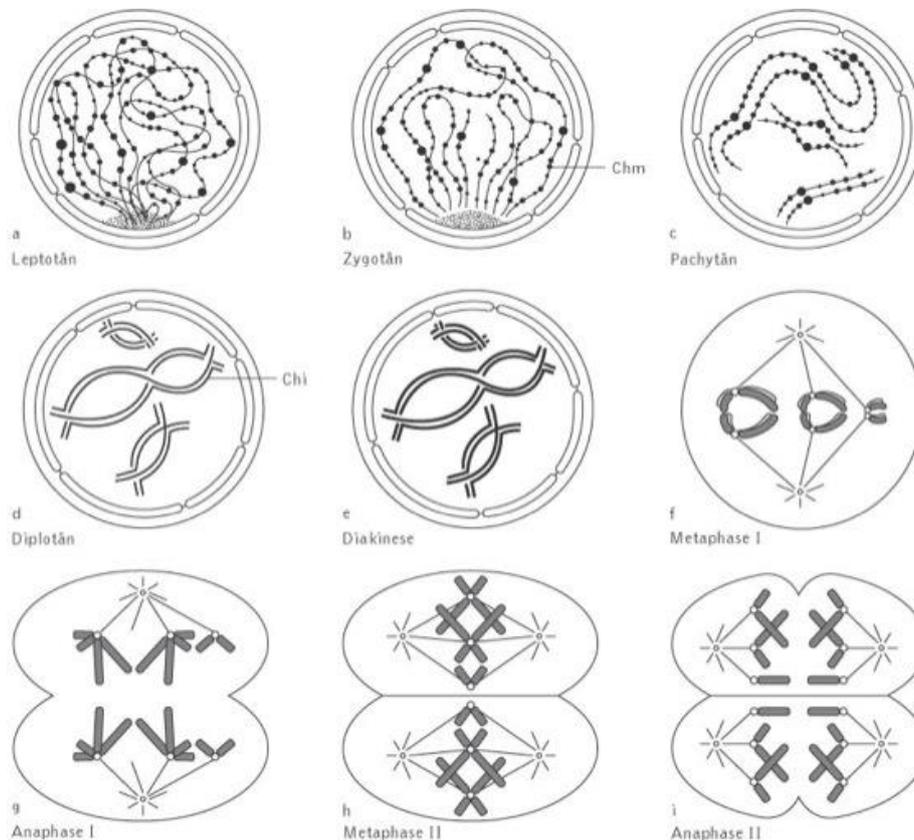


Abbildung 3: Stadien der Meiose in Pflanzen (Spektrum Akademischer Verlag 2001).

In den meisten Organismen werden deutlich mehr DNA-Doppelstrangbrüche initiiert als sich Crossover ausbilden. Die meisten DNA-Doppelstrangbrüche werden als Nicht-Crossover repariert. In Sprosshefe werden etwa 50 % der DNA-Doppelstrangbrüche als Crossover repariert, wodurch sich etwa 80 bis 90 Crossover pro Zelle ergeben. Bei Pflanzen und Tieren ist der Anteil jedoch meistens deutlich geringer. In Pflanzen werden nur etwa 5 % aller DNA-Doppelstrangbrüche zu Crossovern (Osman et al. 2011). In *Arabidopsis* entstehen geschätzt 200 DNA-Doppelstrangbrüche pro Nukleus, wovon nur etwa 10 zu Crossovern repariert werden (Chelysheva et al. 2012). In Mais werden ungefähr 500 DNA-Doppelstrangbrüche initiiert, wobei sich durchschnittlich nur 25 pro Nukleus zu Crossovern entwickeln (Franklin 1999). Der Rest wird als Nicht-Crossover oder anhand der Schwesterchromatide repariert. Ein sogenanntes obligatorisches Crossover pro Bivalent ist in fast allen Spezies für die korrekte Trennung der homologen Chromosomen in der Meiose I notwendig

(Jones und Franklin 2006). Als Faktoren, die die Bildung von Nicht-Crossovers unterstützen, sind zum Beispiel die Helikase FANCM (Crismani et al. 2012) und der RTR-Komplex (Mankouri und Hickson 2007) bekannt. Dies sind sogenannte Anti-Crossover Faktoren, welche aktiv die Ausbildung von Crossovers hemmen. In Maus und Hefe wurde eine Crossover-Homöostase entdeckt, welche bedeutet, dass die Anzahl an Crossover konstant bleibt, auch wenn vermehrt DNA-Doppelstrangbrüche auftreten (Martini et al. 2006). In Mais konnte dieses nicht bestätigt werden, wodurch die Vermutung entsteht, dass dies in bestimmten oder sogar generell in Pflanzen nicht der Fall ist (Sidhu et al. 2015).

1.2 Lokalisation der meiotischen Rekombination

In nahezu allen Spezies ist die Verteilung von Rekombinationsereignissen nicht homogen entlang der Chromosomen. Crossover treten in bestimmten Bereichen weniger Kilobasen, den sogenannten Hotspots, gehäuft auf. Es wurde eine unterschiedliche Verteilung von Crossovers zwischen verschiedenen Spezies beobachtet. Teilweise wurden auch innerhalb von einer Art Unterschiede zwischen männlicher und weiblicher Meiose und auch zwischen den verschiedenen Chromosomen innerhalb einer Spezies hinsichtlich der Crossover-Verteilung festgestellt (Mézard et al. 2015). Die Verteilung der Crossover reflektiert typischerweise die Lokalisation von DNA-Doppelstrangbrüchen. In *Arabidopsis thaliana* korrelieren DNA-Doppelstrangbruch-Hotspots positiv mit einer geringen Nukleosomendichte, offenem Chromatin, Chromatinmerkmalen wie Histon-H3-Lysin-4-trimethylierung (H3K4me3) oder dem Vorhandensein der Histonvariante H2A.Z und sind zumeist in Regionen von Genen bzw. Genpromotoren zu finden (Choi et al. 2013). In *S. cerevisiae*, *Arabidopsis*, Weizen und Mensch finden mehr als 80 % aller Rekombinationsereignisse in weniger als einem Viertel des Genoms statt (Choi et al. 2013; Chen et al. 2008; Mancera et al. 2008; International Wheat Genome Sequencing Consortium 2014; Myers et al. 2005). In vielen Pflanzen sind die meisten Crossover in der Nähe der Chromosomenenden. Die Zentromerregionen sind in vielen Spezies frei von Crossovers. Unabhängig von der physischen Chromosomengröße übersteigt die Anzahl der Crossover selten drei pro Bivalent (Mercier et al. 2015). In Mais (Gore et al. 2009) und Weizen (Saintenac et al. 2009) wurde gezeigt, dass die Crossover-Häufigkeit in den subtelomerischen Regionen höher als in den interstitiellen Regionen ist. Die Ausbildung von Crossovers ist in Zentromer- und Telomerregionen unterdrückt (Lambing et al. 2017).

Es gibt umfangreiche Modifikationen von DNA und Histonen: z.B. DNA-Cytosin-Methylierung und Histon-Methylierung, Acetylierung, Ubiquitinierung und Phosphorylierung. Diese Chromatinmarkierungen sind wichtig für die Genexpression, Genomorganisation und Chromosomenfunktion. Viele dieser Modifikationen, wie zum Beispiel die DNA-Methylierung, werden epigenetisch während der DNA-Replikation vererbt (Law und Jacobsen 2010b; Henderson

und Jacobsen 2007). In *Arabidopsis* führt eine erhöhte Acetylierung von H3 (Hypoacetylierung) zu einer veränderten Chromosomenachse, Chiasmaanzahl und -verteilung. Die Chiasmaanzahl verringert sich in den Chromosomen 1 und 2 und erhöht sich in Chromosom 4 (Perrella et al. 2010). Transposons und repetitive Sequenzen sind in Pflanzen typischerweise heterochromatisch und stark modifiziert durch DNA-Cytosinmethylierung und Histon H3K9 Demethylierung sowie mit komplementären kleinen RNAs angereichert (Law und Jacobsen 2010b; Henderson und Jacobsen 2007). In heterochromatischen Regionen, inklusive Zentromeren, ist die Ausbildung von Crossovern grundsätzlich unterdrückt (Giraut et al. 2011; Cokus et al. 2008; Zhang et al. 2006; Copenhaver et al. 1999). Möglicherweise ist dies in repetitiven Sequenzen von Vorteil, aufgrund andernfalls einer hohen Wahrscheinlichkeit illegitimer nicht-allelischer Rekombinationsereignisse, welche gefährlich für die Genomintegrität sind. In Menschen werden zentromer-nahe Crossover mit einer Nicht-Trennung der Chromosomen assoziiert (Lamb et al. 2005). Ein übliches Muster der Crossover-Verteilung ist ein Vorkommen in den distalen Regionen, also zu den Enden der Chromosomen, wie zum Beispiel in Getreiden und in der männlichen, menschlichen Meiose. Die entgegengesetzte Situation, proximale Crossover, welche in der Nähe der Zentromere sind, wurde ebenfalls beschrieben. In beiden Fällen sind die Zentromere frei von Crossover-Ereignissen (Mézard et al. 2015).

Studien haben gezeigt, dass die Rekombination in engem Zusammenhang mit der Remodellierung der homologen Chromosomen steht, was in der Prophase I stattfindet (Kleckner 2006). In den meisten Spezies sind Chromosomenpaarung, Synapsis und Rekombinationsverlauf stark voneinander abhängig (Zickler und Kleckner 1999). In manchen Spezies zeigt sich ein räumlich-zeitlicher Zusammenhang zwischen Rekombinationsinitiation und der Ausbildung von Crossovern. In der Gerste zeigt sich eine fast vierfache Anzahl an Crossovern an Stellen der Synapsisinitiation (Higgins et al. 2014). In Sprosshefe scheint sich jede Stelle der Synapsisinitiation zu einem Crossover zu entwickeln (Fung et al. 2004).

1.3 Meiotische Rekombination in Gerste

Gerste (*Hordeum vulgare* L.) ist ein landwirtschaftlich wichtiges Getreide und gehört zum Stamm der *Triticeae*. Es ist das am viertmeisten angebaute kleinkörnige Getreide in der Welt nach Weizen, Mais und Reis. Dadurch spielt es eine wichtige Rolle in genomischen, genetischen und zytogenetischen Studien (Ashida et al. 2007; Mayer et al. 2011). Die kultivierte Gerste ist diploid. Sie hat eine haploide Genomgröße von 5,1 Gigabasenpaaren verteilt auf 7 Chromosomen mit vermutlich etwa 53.220 codierenden Genen (Mayer et al. 2012). Die Gerste gilt als Spezies mit einem sehr großen Genom und einem hohen Anteil (80 %) an repetitiven Sequenzen. Studien zeigten, dass es eng miteinander gekoppelte Gene gibt, die sogenannte Gen-Inseln bilden, die durch große Regionen repetitiver

Sequenzen unterbrochen werden (Rostoks et al. 2002; Wicker et al. 2009). Die Gendichte entlang der Chromosomen ist heterogen, wobei der Hauptanteil der Gene bei Getreiden in hochrekombinierenden distalen Chromosomenregionen liegt (Mayer et al. 2011).

In vielen Spezies gibt es eine Tendenz für das Vorkommen von Chiasmata in bevorzugten Regionen entlang der Chromosomen, wobei in manchen Spezies, wie in Gerste und anderen Gräsern die Chiasmatalokalisierung extrem stark auf die distalen Regionen im Chromosom beschränkt ist, was durch zytologische Analysen mittels Chiasma-Zählung und Immunlokalisierung von MLH1 (Klasse I Crossover Marker) im Pachytän bestätigt wurde (Higgins et al. 2012). In zentromerischen und perizentromerischen Chromosomenregionen bilden sich keine Crossover aus. Diese Regionen schließen etwa 50 % der physischen Karte ein (Mayer et al. 2012; Künzel und Waugh 2002). Die Lokalisierung von Chiasmata in den distalen Regionen von Gerstenchromosomen beschränkt die verfügbare genetische Variation für die Pflanzenzüchtung. Diese Heterogenität in der Verteilung der Crossover spiegelt sich in der Verteilung der Gene auf dem Chromosomen wieder, welche ebenfalls eine starke Anreicherung in den distalen Regionen zeigen (Higgins et al. 2012). Dies ist ebenso in Weizen, Hafer, Roggen und vielen Futtergräsern der Fall (Mayer et al. 2012; Künzel und Waugh 2002; Ramsay et al. 2014; Künzel et al. 2000). Dieses Verteilungsmuster von Crossovern wurde nicht in *Arabidopsis* oder in Reis und Gräserpezies mit deutlich kleineren Genomen gefunden (Salomé et al. 2012; Chen et al. 2002). Trotz dieser Tendenz lokalisiert ein erheblicher Anteil an Genen außerhalb distaler Chromosomenregionen. In Gerste befinden sich über 30 % der Gene in Bereichen, die wenig oder gar nicht rekombinieren (Mayer et al. 2011). In Weizen und Gerste wurde nachgewiesen, dass Gene auch in zentromernahen Bereichen vorkommen (Mayer et al. 2012; Choulet et al. 2014). Auch innerhalb der genreichen distalen Chromosomenregionen kann die Rekombinationshäufigkeit vielfach variieren (Higgins et al. 2012). Die Chiasmaanahl übersteigt in der Gerste bei keinem Chromosom durchschnittlich drei pro Bivalent (Tabelle 1).

Tabelle 1: Durchschnittliche Anzahl an zytologisch ermittelten Chiasmata in den einzelnen Chromosomen der Gerste (Colas et al. 2016).

Chromosom	1H	2H	3H	4H	5H	6H	7H	Gesamt
Chiasmaanahl	2,4	2,9	3,0	2,5	2,5	2,6	2,4	18,4

Die Unterdrückung von Rekombination in zentromerischen Regionen ist ein typisches Merkmal für *Triticeae* Spezies mit großen Chromosomen (Aliyeva-Schnorr et al. 2015). Die Ausbildung von Crossovern korreliert mit der Chromatinstruktur. In Gerste und anderen Gräsern mit ähnlich großen Chromosomen befindet sich Euchromatin entlang der distalen Regionen der Chromosomen, wohingegen die heterochromatischen Bereiche der DNA in den perizentromerischen Regionen lokalisieren. Heterochromatin tritt jedoch auch in interstitiellen Regionen und subtelomerischen

Regionen auf. Die Histonmodifikationen H3K9me3, H3K27me3, H3K4me3 und H4K16ac sind assoziiert mit transkriptionsaktiver genreicher DNA, welche hauptsächlich in den distalen Regionen angereichert sind (Higgins et al. 2012; Fuchs et al. 2006). Heterochromatische Markierungen wie 5-Methylcytosin, H3K9me2, H3K27me2 und H4K20me1 kommen entlang des ganzen Chromosoms vor. In den distalen Chromosomenregionen ist die Konzentration dieser heterochromatischen Markierungen deutlich geringer. Dies lässt auf einen Zusammenhang zwischen euchromatischen Regionen und der Ausbildung von Crossovers schließen (Abbildung 4). Eine ähnliche Verteilung von Eu- und Heterochromatin wurde in der Gerste beobachtet. Diese Korrelation wurde auch im Roggen entdeckt, wodurch vermutet wird, dass die Ausbildung von Crossovers in heterochromatischen Bereichen nahezu ausgeschlossen ist (Higgins et al. 2014; Mézard et al. 2015;).

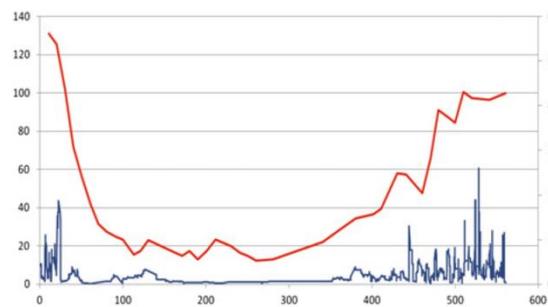


Abbildung 4: Schema der Verteilung des Gengehaltes und der meiotischen Rekombinationsrate über der physikalischen Karte der Gerstenchromosoms 3H (Aliyeva-Schnorr et al. 2015). (Rot) Gengehalt (Blau) Rekombinationsrate

In Gerste existiert eine räumlich-zeitliche Asymmetrie in der Ausbildung der Chromosomenachse und der Synapsis der homologen Chromosomen während der meiotischen Prophase I. Es zeigt sich, dass das bevorzugte Auftreten von Crossovers in den distalen Regionen mit dem Timing der Rekombinationsinitiation in Zusammenhang steht. Distale Chiasmata sind solchen in interstitiellen und proximalen Regionen zahlenmäßig etwa um das 25-fache in der Gerstensorte Morex überlegen. Die Rekombinationsinitiation setzt in proximalen und interstitiellen Regionen später ein, als in den subtelomerischen bzw. distalen Regionen. Es zeigt sich im zeitlichen Verlauf dabei ein Unterschied von zwei bis drei Stunden. Die Beobachtungen des zeitlichen Unterschiedes der Initiationsereignisse entlang der Chromosomen in Gerste stehen im Gegensatz zu Beobachtungen in *Arabidopsis* oder *Brassica*. In diesen Spezies verläuft die Ausbildung der Chromosomenachse sehr schnell während der späten G2 bzw. dem Leptotän. Die Formierung der Chromosomenachse verläuft synchron entlang der Chromosomen. Auch ist die Unproportionalität von distalen zu interstitiellen Chiasmata weniger deutlich ausgeprägt als in Gerste. In *Arabidopsis* liegt die Rate bei 3:1 (Higgins et al. 2012).

In der Gerste beginnt der zeitlich-räumliche Unterschied vermutlich schon in der prämeiotischen S-Phase. Die distalen euchromatischen Chromosomenregionen werden zuerst repliziert. Dies dauert

etwa 4 Stunden. Die interstitiellen DNA-Regionen sind etwa zwei Stunden später vollständig repliziert. Danach werden die proximalen heterochromatischen Bereiche etwa 13 Stunden nach Beginn der Replikation fertiggestellt (Higgins et al. 2012). Dieses Muster wurde auch in somatischen Gerstenzellen beobachtet. Möglicherweise ist das Timing der Rekombinationsinitiation ein Faktor, der die Ausbildung von Crossovers beeinflusst, indem die frühen DNA-Doppelstrangbrüche höhere Chancen haben ein Crossover auszubilden, da diese nicht durch eine Interferenz beeinflusst werden. In Gerste tritt der erste DNA-Doppelstrangbruch in den früh replizierenden DNA-Regionen auf. Die Entscheidung zwischen Crossover und Nicht-Crossover wird schon früh getroffen. Vermutlich schon bevor in den interstitiellen Regionen DNA-Doppelstrangbrüche auftreten. In den distalen Regionen sind RAD51/DMC1-Foki etwa zwei bis drei Stunden früher zu beobachten. In Spezies mit räumlich-zeitlichen Unterschieden in der Rekombinationsinitiation wie Gerste, wird dadurch vermutlich die gegenseitige Interferenz von Klasse I Crossover verstärkt. Wahrscheinlich ist dies jedoch nicht der einzige Faktor für die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen als Nicht-Crossover, da die Klasse II Crossover nicht von der Interferenz betroffen sind. Die Ausbildung eines Crossovers kann auch durch sogenannte Anti-Crossover Faktoren verhindert werden (Higgins et al. 2014; Aliyeva-Schnorr et al. 2015; Mézard et al. 2015; Higgins et al. 2012).

1.4 Beeinflussung der meiotischen Rekombination

Die Entwicklung von Methoden, um die Häufigkeit von Crossovers in Crossover-armen Regionen zu steigern, soll die genetische Diversität erhöhen und einen Vorteil für die Pflanzenzüchtung bieten. Es gibt verschiedene Faktoren, die die Crossover-Häufigkeit und -Verteilung beeinflussen. Durch die Identifikation von Anti-Crossover-Faktoren wird es möglich werden, die Rekombinationsfrequenz zu verändern. Eine erhöhte Rekombination kann nützlich sein, um zum Beispiel unerwünschte Verbindungen von Genen zu unterbrechen, um neue Kombinationen von nützlichen Allelen zu erhalten. Die Anzahl an Crossovers wurde in *Arabidopsis* durch das Ausschalten von Anti-Crossover-Faktoren bis zum Zehnfachen erhöht (Crismani et al. 2012; Mercier et al. 2015). Unbekannt ist, ob die Mutation von den gleichen Genen denselben Effekt in Spezies mit landwirtschaftlichem Interesse hat (Mercier et al. 2015).

Die Desynapsis Mutante der Gerste mit einer HvMlh3 Mutation zeigt eine verringerte Anzahl an Chiasmata im Gegensatz zum Wildtyp. In der Mutante und im Wildtyp sind die homologen Chromosomen augenscheinlich im Pachytän gepaart, jedoch setzt die Synapsis bei der Mutante später ein. Die Anzahl von Chiasmata verringerte sich dadurch von 18,4 auf 9,2 (Colas et al. 2016). In Tomate zeigt sich eine Erhöhung der Rekombinationsrate um etwa 10 % durch die Überexpression von MutL homologen1 (MLH1) (Wittich et al. 2009). In *Arabidopsis* zeigt sich bei einer

Überexpression von RAD51 eine Erhöhung der Rekombinationshäufigkeit um etwa das Doppelte (Betzner et al. 2004).

Die Temperatur hat einen Effekt auf die Anzahl von Crossovers und dessen Verteilung entlang der Chromosomen. In Gerste wird die Meiose bei Temperaturen ab 35 °C unterbrochen. Bei einem Vergleich von den Temperaturen 22 °C und 30 °C zeigt sich während der Meiose bei der höheren Temperatur eine Abnahme der Crossover-Ereignisse in den distalen Regionen, wobei die Anzahl der Crossover in den interstitiellen Bereich ansteigt. Dies wird assoziiert mit der Zunahme der Länge des synaptonemalen Komplexes. Dieser Effekt zeigt sich nicht in allen Chromosomen gleich. Möglicherweise hat hier die Chromosomenstruktur einen Einfluss. Bei 30 °C zeigt sich eine geringe Abnahme der Gesamtanzahl an Crossover pro meiotische Zelle von 14,8 auf 13,5 im Vergleich zu 22 °C (Higgins et al. 2014; Higgins et al. 2012).

Die Verfügbarkeit an Nährstoffen hat ebenfalls einen Einfluss auf die meiotische Rekombination. Ein erhöhter Phosphat- oder Kaliumgehalt in der Erde erhöht die Rekombinationsrate in Gerste, Roggen und Reis. Vermutlich wird durch den veränderten Nährstoffgehalt die Physiologie in der Zelle und die Konformation der DNA verändert (Lambing et al. 2017).

Viele epigenetische Modifizierungen oder posttranslationale Proteinmodifikationen, wie DNA-Methylierung, Histon-Methylierung, Acetylierung, Phosphorylierung oder Ubiquitinierung haben einen Einfluss auf die Verteilung und Häufigkeit meiotischer Rekombinationsereignisse. Ein Einfluss der epigenetischen Markierungen auf die Rekombination wurde in *Arabidopsis* gezeigt. Es zeigt sich eine positive Korrelation mit H3K4me₃, aber die Rekombinationsereignisse korrelieren mehr mit dem modifizierten Histon H2A.Z und noch mehr mit der lokalen Hypomethylierung der DNA (Mézard et al. 2015; Choi et al. 2013).

In dem Pilz *Ascobolus immersus* zeigte sich eine Assoziation zwischen DNA-Methylierung und der Unterdrückung von meiotischer Rekombination (Colot et al. 1996). Studien in *Schizosaccharomyces pombe* lassen vermuten, dass Histon-Acetyltransferasen und ATP-abhängige Chromatinremodellierungsfaktoren kooperativ an der lokalen Veränderung der Chromatinstruktur beteiligt sind. Dies ist zum Beispiel bei der selektiven Aktivierung der Transkription und bei der Aktivierung der meiotischen Rekombination in einem Rekombinations-Hotspot der Fall (Yamada et al. 2004). Histon-Acetylierung führt zu einer offenen Chromatinstruktur in den Regionen mit den modifizierten Histonen. Trichostatin A ist ein wirksamer und reversibler Histon-Deacetylaseinhibitor, welcher alle Arten von Histon-Deacetylasen beeinflusst, was in der Hyperacetylierung von den Kern-Histonen resultiert (Fenic et al. 2008). In Säugern wurde gezeigt, dass eine Behandlung mit Trichostatin A die Kondensation des Chromatins stört. Es zeigt sich eine erhöhte Frequenz von

zurückgebliebenen Chromosomenfragmenten und Chromatinbrücken in der Anaphase I und Telophase I (Wang et al. 2006). Auch in *Arabidopsis* hat Trichostatin A einen Einfluss auf die Meiose. Es zeigt sich eine Veränderung in der Verteilung und der Anzahl an Chiasmata, sowie teilweise ein Verlust des obligatorischen Crossovers (Perrella et al. 2010).

Die posttranslationale Regulation durch die Zip3/RNF212 SUMO E3 Ligase ist in vielen Spezies wichtig für die Regulierung der Crossover-Raten. In *S. cerevisiae* erfordern Klasse I Crossover eine SUMOylierung (kleine Ubiquitin-verwandete Modifikatoren) von den axialen Proteinelementen Topo II und Red1. Die Neddylierung hat Einfluss auf die Lokalisation der Crossover. In *Arabidopsis* bewirkt eine gestörte Neddylierung eine Anhäufung der Crossover in den subtelomerischen Regionen der Chromosomen, ohne die durchschnittliche Anzahl an Crossovern zu beeinflussen, wobei es jedoch zum Verlust des obligatorischen Crossovers kommt. Diese Crossover-Lokalisierungsanomalien sind mit partieller Synapsis assoziiert (Mézard et al. 2015). Die meisten Proteine, die die Rekombinase Rad51 regulieren, werden durch Phosphorylierung und/oder SUMOylierung modifiziert (Krejci et al. 2012). Die Rekombinationshäufigkeit kann durch verschiedene Chemikalien erhöht werden. Mittels Actinomycin D oder Diepoxybutan wurde die Rekombinationshäufigkeit in einem Intervall zwischen zwei gekoppelten Markern in der Gerste erhöht (Sinha und Helgason 1969). In *Arabidopsis* kann eine Erhöhung der Rekombinationshäufigkeit um das etwa Zwei- bis Siebenfache durch Chemikalien, um das Vierfache durch einen Hitzeschock und um das Dreifache durch UV-Bestrahlung erreicht werden (Preuss und Copenhaver 2000).

1.5 DNA-Methylierung

Epigenetische Informationen sind prinzipiell in drei molekularen Systemen gespeichert. Dies sind die DNA-Methylierung, die posttranslationale Modifikation von Histon-Proteinen und nicht-codierende RNA-Moleküle. Zusammen organisieren diese Systeme die Struktur und Konfiguration des Chromatins, wodurch die Zugänglichkeit für die Transkription beeinflusst wird. Dadurch können bestimmte Gene aktiviert oder unterdrückt werden (Feng et al. 2010; Saze 2008).

In allen eukaryotischen Genomen sind repetitive Sequenzen enthalten. Manche dieser repetitiven Sequenzen, wie rRNA-Gene oder zentromer-assoziierte Repeats haben eine wichtige Funktion im Organismus. Andere repetitive Sequenzen, wie Transposons oder Viren sind molekulare Parasiten, die einen schädlichen Effekt auf deren Wirt haben können. In vielen Eukaryoten sind die repetitiven Sequenzen durch die Bindung einer Methylgruppe an das Kohlenstoffatom an der Position 5 am Cytosinring methyliert, wodurch 5-Methyldeoxycytidin entsteht (Bender 1998). Diese Reaktion wird durch Methyltransferase katalysiert (Bestor et al. 1988; Bird 1992). In Tieren ist die Cytosinmethylierung zum Großteil auf CG-Sequenzen beschränkt. Im Gegensatz dazu werden in Pflanzen zusätzlich auch CHG und CHH (H=A, C oder T) Sequenzen methyliert (Oakeley und Jost 1996).

Die DNA-Methylierung wird während der DNA-Replikation durch z. B. DNA-Methyltransferase 1 (MET1) und Chromomethylase 3 (CMT3) bei den symmetrischen Sequenzen (CG und CHG) auf den neu synthetisierten Strang transferiert (Lindroth et al. 2001; Kankel et al. 2003). Die „Domains rearranged Methyltransferase 2“ (DRM2) ist notwendig, um die DNA-Methylierung auf die asymmetrischen Sequenzen (CHH) des neu synthetisierten Strangs zu übertragen (Goll und Bestor 2005; Law und Jacobsen 2010a). In methylierten Regionen ist die RNA-Polymerase-II-abhängige Transkription unterdrückt. Dies geschieht entweder durch Verhinderung der Transkriptionsinitiierung oder durch Hemmung der Elongation des Transkripts (Kass et al. 1997; Rountree und Selker 1997; Barry et al. 1993). Dadurch wird die Expression von Genen in Transposons verhindert, wodurch eine mögliche DNA-Umlagerung vermieden wird. Die Methylierung von Transposons kann dazu führen, dass benachbarte Wirtsgene ebenfalls reprimiert werden (Bender 1998).

In Pflanzengenomen liegt der hauptsächliche Unterschied im Muster der Cytidinmethylierung zwischen genreichen und repetitiven Sequenzen, jedoch gibt es entlang der Gene bzw. Genpromotoren Variationen in der DNA-Methylierung, wodurch unter anderem die Genexpression kontrolliert wird (Martienssen und Colot 2001).

DNA-Methylierung und die Remodellierung des Chromatins haben einen Effekt auf die Chromosomenstruktur. Deren Einfluss auf die meiotische Rekombination ist bis jetzt nicht komplett verstanden (Melamed-Bessudo und Levy 2012). Die Cytidinmethylierung korreliert mit reduzierter homologer Rekombination. Die Methylierung von repetitiven Sequenzen verhindert so möglicherweise die ektopische Rekombination, was sonst zu Translokationen und anderen Chromosomenumlagerungen führen kann (Bender 1998). Die Cytidinmethylierung ist wichtig für das Transposon-Silencing und die epigenetische Regulation von endogenen Genen, auch wenn das Ausmaß, in welchem die DNA-Modifikation das Genom reguliert, immer noch unbekannt ist (Bird 2002; Goll und Bestor 2005). In *Arabidopsis* sind das perizentromerische Heterochromatin, repetitive Sequenzen und Regionen, die kleine interferierende RNAs produzieren (small interfering RNAs) stark methyliert. Über ein Drittel der exprimierten Gene enthalten DNA-Methylierungen in den transkribierenden Regionen. Nur etwa 5 % der Gene zeigen eine DNA-Methylierung in Promotorregionen. Gene, die in transkribierenden Regionen methyliert sind, sind stark exprimiert und konstitutiv aktiv. Gene, bei denen die Promotorregion methyliert ist, zeigen einen erhöhten Grad an gewebespezifischer Expression (Zhang et al. 2006). In einer *Arabidopsis*-Mutante, in der ein Protein, welches für die DNA-Methylierung notwendig ist, ausgeschaltet wurde, war die Rate der meiotischen Rekombination in euchromatischen Regionen signifikant höher als im Wildtyp. In heterochromatischen perizentromerischen Chromosomenregionen zeigt sich durch die veränderte Methylierung keine veränderte Anzahl an Crossover in diesen Bereichen. Daraus ist zu schließen,

dass zusätzliche Faktoren zur DNA-Methylierung einen Einfluss auf die Unterdrückung der Rekombination in heterochromatischen Bereichen haben (Melamed-Bessudo und Levy 2012).

Eine andere Methode, ohne Verwendung genetisch modifizierter Organismen, die DNA-Methylierung zu inhibieren, ist die Anwendung von Chemikalien. Die Anwendung von Inhibitoren ermöglicht im Gegensatz zu genetisch modifizierten Organismen eine partielle und vorübergehende Beeinflussung der DNA-Methylierung. Die Chemikalien Zebularin und 5-Azacytidin (Abbildung 5) haben einen Einfluss auf die DNA-Methylierung. Beide Stoffe sind Analoga von Cytidin und werden während der DNA-Replikation in die DNA eingebaut. Sie bilden wahrscheinlich kovalente Addukte mit Methyltransferasen (Santi et al. 1983), wodurch diese gehemmt werden und somit die DNA-Methylierung reduziert wird. 5-Azacytidin ist ein häufig genutzter Inhibitor der DNA-Methylierung in Pflanzen und Tieren. Es induziert Hypomethylierung, transkriptionelle Reaktivierung und Defekte in der Entwicklung von Pflanzen und Tieren. Zudem wird dieser Stoff in der Krebsforschung genutzt. Zebularin wirkt auf ähnliche Weise wie 5-Azacytidin, bietet jedoch den Vorteil, dass es weniger toxisch ist und in Lösung deutlich stabiler ist. Eine demethylierende und reaktivierende Wirkung wurde in *Neurospora* gezeigt (Cheng et al. 2003).

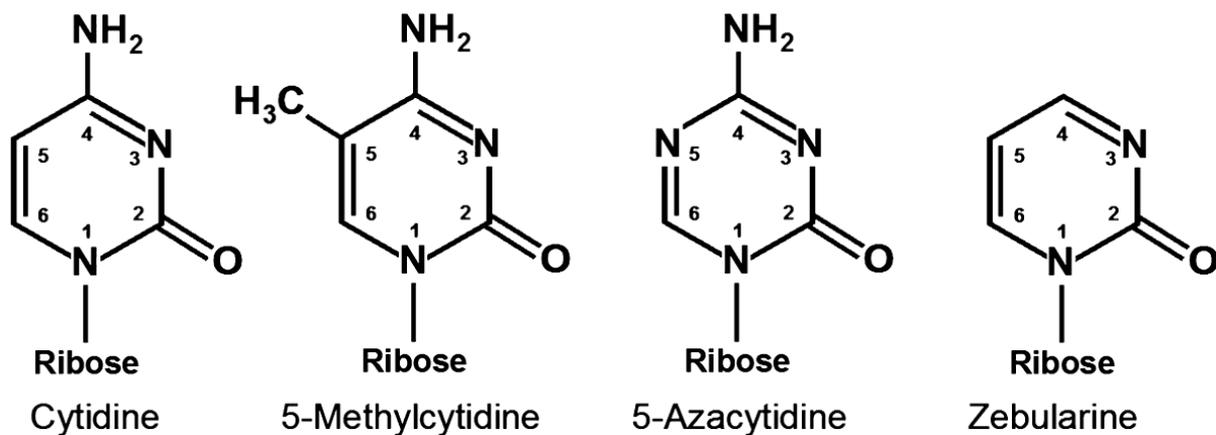


Abbildung 5: Chemische Struktur von Cytidin, dessen methylierter Form, 5-Methylcytidin und den Methylierungsinhibitoren 5-Azacytidin und Zebularin (Baubec et al. 2009).

1.6 Messung der meiotischen Rekombination

Zukünftige Bestreben, die beschränkte Verteilung von Rekombinationsereignissen in Pflanzen zu überwinden, erfordern effiziente Methoden zur Bestimmung von möglichen Veränderungen in der Rekombination durch eine Behandlung. Es gibt viele verschiedene Methoden, um die Rekombination in Pflanzen zu messen. Es können molekulare Marker (Salomé et al. 2012), zytologische Visualisierungen von Crossovers (Sybenga 1966; Phillips et al. 2013), fluoreszierende Pollen (Yelina et al. 2013), Tetradenanalysen (Copenhaver et al. 2000), fluoreszierende Samen (Melamed-Bessudo et al. 2005) und verschiedene Ansätze zum Genotypisieren von Pollen angewandt werden (Dreissig et al. 2015; Drouaud und Mézard 2011; Khademian et al. 2013). Diese Methoden wurden alle erfolgreich

für die Charakterisierung der Verteilung von Rekombinationsereignissen angewendet. Jede dieser Methoden hat Vor- und Nachteile. Für die Anwendung von molekularen Markern ist eine Segregationspopulation notwendig, um die Rekombination zu analysieren. Dies ist aufwendig und bei manchen Pflanzenspezies sehr schwierig. Zytologische Analysen sind weiter verbreitet und für viele Pflanzenspezies anwendbar. Crossover können anhand der Chromosomenmorphologie und Antikörpern gegen meiotische Proteine, welche an der Ausbildung von Crossovers beteiligt sind, ermittelt werden. Das Zählen von Chiasmata kann jedoch nur in den meiotischen Stadien Diakinese oder Metaphase I durchgeführt werden. Diese Methode ist jedoch limitiert, dadurch dass nur für wenige Spezies Antikörper gegen meiotische Proteine verfügbar sind. Die Tetradenanalyse in Verbindung mit der Anwendung von Fluoreszenzmarkern ist eine effiziente Methode mit hohem Durchsatz, welche jedoch bis jetzt auf die Modelnpflanze *Arabidopsis* beschränkt ist. Es werden dafür Mutanten benötigt, in denen die vier meiotischen Sporen zusammen bleiben. In Kombination mit Fluoreszenzmarkern, die durch einen Pollen-spezifischen Promotor exprimiert werden, zeigt diese Mutante direkt die Ergebnisse der meiotischen Rekombination in den einzelnen Pollenkernen, durch unterschiedliche Fluoreszenz in den Tetraden, welche auf die Rekombination in einem Intervall zwischen zwei Fluoreszenzmarkern auf dem gleichen Chromosom beruht. Eine ähnliche Technik ist für die direkte Beobachtung von Crossovers in Samen entwickelt worden mit Fluoreszenzproteinen, die durch einen Samen-spezifischen Promotor exprimiert werden. Für diese Methode wird kein spezifischer Phänotyp benötigt, wie bei der Tetradenanalyse, bei der die Pollen zusammen bleiben müssen. Diese transgene Methode ist für Getreide nicht sehr sinnvoll trotz der relativ hohen Durchsatzrate, da die Anzahl an Samen deutlich geringer ist, als die Anzahl an produzierten Pollen. Zusätzlich werden Tester-Linien benötigt, in denen die Fluoreszenzproteine durch einen samenspezifischen Promotor exprimiert werden (Wijnker und Jong 2008).

Das Sequenzieren von einzelnen Zellen ist eine neue Methode, durch die direkt das Resultat der Meiose in einzelnen haploiden Zellen gemessen werden kann (Yelina et al. 2013; Copenhaver et al. 2000; Dreissig et al. 2015; Drouaud und Mézard 2011; Khademian et al. 2013). Dies können zum Beispiel Mikrosporen oder einzelne Pollenkerne sein. Zum Genotypisieren von einzelnen Pollenkernen gibt es eine Methode, welche auf dem Sortieren mit dem Durchflusszytometer basiert. Es werden einzelne haploide Pollenkerne sortiert, welche dann durch die Anwendung von KASP-Markern genotypisiert werden. Diese Methode hat das Potential einzelne Zellen zu analysieren, jedoch ist sie beschränkt durch die Anzahl der KASP-Marker, die auf einmal getestet werden können. Dieses Problem kann durch die Gesamtgenomamplifikation überwunden werden, wodurch mehrere Kopien der haploiden DNA eines Pollenkerns für eine Markeranalyse generiert werden. Zudem ist diese Methode abhängig von Einzelnukleotid-Polymorphismen, und ist somit auf Kreuzungen von zwei Sorten angewiesen (Dreissig et al. 2015).

1.7 Zielstellung

Diese Arbeit wird im Rahmen eines Projektes erstellt, in dem durch den Einsatz von Chemikalien die genetische Diversität für die Pflanzenzüchtung ohne gentechnische Methoden erhöht werden soll. Durch Beeinflussung des Epigenoms soll die Frequenz und Verteilung meiotischer Rekombinationsereignisse in der Gerste beeinflusst werden. Gerste ist ein wichtiges Getreide, in dem über 30 % der Gene außerhalb der hochrekombinierenden Chromosomenregionen liegen (Aliyeva-Schnorr et al. 2015, Abbildung 4). Die Rekombinationsrate in den behandelten Gerstenpflanzen soll dann mittels Genotypisierung einzelner Pollenkerne anhand molekularer Marker für SNPs (Einzelnukleotid-Polymorphismus, single nucleotide polymorphisms) bestimmt werden. Diese Ergebnisse sollen zusätzlich auch zytologisch überprüft werden. Häufig kommt es wie zum Beispiel in Gerste, Mais und Tomate vor, dass sich die genetische und die physische Karte unterscheiden, wodurch die Wichtigkeit der zytologischen Bestätigung molekularer Ergebnisse verdeutlicht wird (Aliyeva-Schnorr et al. 2015). Für die Anwendung der Chemikalien muss zunächst eine Methode entwickelt werden, wie eine Chemikalie möglichst effektiv vor der beginnenden oder während der Meiose in die Antheren der Ähren gelangt. Dafür, und um das richtige Wachstumsstadium der Pflanze zum Injizieren der Substanz zu bestimmen, wird das Thymidin-Analogon 5-Ethynyl-2'-deoxyuridin (EdU) verwendet. Durch eine chemische Reaktion kann EdU fluoreszenzmarkiert werden, und somit mit einem Fluoreszenzmikroskop detektiert werden. EdU muss vor der S-Phase der Meiose in die Pflanze injiziert werden, damit es anstatt Thymidin in die DNA eingebaut werden kann. Durch die Mikroskopie kann dann festgestellt werden, ob EdU in die Antheren gelangt ist und ob es zum richtigen Zeitpunkt injiziert wurde. Als Kontrolle dienen EdU markierte somatische Zellkerne. Ziel ist der Nachweis von EdU-markierten meiotischen Zellen.

Zusätzlich zur Injektionsmethode muss eine effiziente Methode entwickelt werden, mit der einzelne Pollenkerne genotypisiert werden können. Dafür sollen molekulare fluoreszierende Marker verwendet werden. Primerpaare, spezifisch für verschiedene SNPs der Gerstenvarietäten Barke und Morex, sollen abgeleitet werden. Für die spätere Anwendung der Chemikalien wird ein Morex x Barke F1 Hybrid verwendet. Beide Primerpaare mit jeweiliger Sonde zur Fluoreszenzbestimmung müssen während der PCR simultan mit der DNA aus einem haploiden Pollenkern funktionieren damit die Rekombinationshäufigkeit in dem Intervall zwischen den Primerpaaren in behandelten und unbehandelten Hybriden gemessen und verglichen werden kann. Die Zielregion befindet sich auf dem Gerstenchromosomen 3H. Diese Genotypisierung soll optimiert werden, damit für die erfolgreiche Genotypisierung einer aussagefähigen Anzahl an Pollenkerne möglichst wenig Reaktionen durchgeführt werden müssen, um Material und Zeit einzusparen.

Nachdem eine Injektionsmethode entwickelt wurde, sollen Chemikalien zur Beeinflussung epigenetischer Faktoren getestet werden. Dabei soll der Einfluss auf die meiotische Rekombination hinsichtlich Crossover Häufigkeit und Verteilung bestimmt werden. In dieser Arbeit soll der Einfluss der DNA-Methylierung auf die meiotische Rekombination in der Gerste untersucht werden. Dafür wurden die Chemikalien Zebularin und 5-Azacytidin getestet. Ein Effekt der Chemikalien sollte zunächst zytologisch bestimmt werden.

2 Methoden

2.1 Pflanzenwachstum

Für die Versuche wurden Gerstenpflanzen der Sorten Barke, Morex und F1 Hybriden aus den beiden Varietäten angezogen. Die Gerstensamen wurden auf feuchtem Filterpapier angekeimt und nach etwa einer Woche in Erde überführt. Die Pflanzen wuchsen im Gewächshaus bei 16 Stunden Licht pro Tag. Der Sollwert für die Temperatur am Tag war 18 °C, der für die Nacht 16 °C. Nach etwa 6 bis 8 Wochen waren die Pflanzen in einem Stadium, in dem die Meiose beginnt und konnten dann für die Versuche verwendet werden.

2.2 Behandlung der Gerste mit EdU

Die Gerstenpflanzen wurden nach ungefähr 8 Wochen mit EdU behandelt. Das EdU wurde mittels einer Spritze in die Pflanzen injiziert. Injiziert wurde oberhalb der Ähre, bis aus dem Spross ein Tropfen herauskam. Die Ähre sollte so mit der EdU Lösung umgeben sein, damit das EdU in die Ähre diffundieren konnte. Nach der Behandlung mit EdU wurde die Pflanze nach verschiedenen Zeiten nach der Injektion abgeschnitten und die Ähre in Fixierungslösung gegeben. Durch die Fixierung wurden die Stoffwechselprozesse in den Zellen angehalten und konserviert. Ziel dieser Versuche war es, eine optimale Methode zum Injizieren zu entwickeln und den richtigen Zeitpunkt für die Injektion hinsichtlich Größe der Pflanze bzw. Ähre zu finden. Zu Beginn wurden verschiedene EdU Konzentrationen getestet (10 mM, 1 mM und 100 µM EdU in 1xPBS). Zudem wurde untersucht, ob es Unterschiede bei der EdU-Markierung innerhalb einer Ähre gibt. Dies wurde mit Pflanzen durchgeführt, die mit 1 mM EdU in 1x PBS behandelt wurden. Dazu wurden die Antheren von jeweils einer Blüte einzeln gesammelt und fixiert. Die Pflanzen wurden nach verschiedenen Zeiten fixiert, um herauszufinden, nach welcher Zeit die verschiedenen Stadien der Meiose in den beiden Genotypen Barke und Morex und zusätzlich auch in F1 Hybriden dieser beiden Sorten markiert sind. Zusätzlich wurde getestet, ob eine erneute Injektion alle 24 oder 48 Stunden sinnvoll ist, um sicher zu gehen, dass bei jeder Replikation EdU vorhanden ist, damit die meiotischen Zellen markiert sind. Damit sollte die Möglichkeit ausgeschlossen werden, dass die Markierung mit EdU nicht funktioniert hat, weil es schon aufgebraucht wurde. Des Weiteren wurde eine andere Methode zum Applizieren der

EdU-Lösung getestet (Abbildung 6). Dabei wurde ein Faden durch den Knoten, unterhalb oder oberhalb der Ähre geführt. Beide Enden des Fadens wurden in ein Röhrchen mit EdU Lösung gesteckt. Auch mit dieser Methode wurden verschiedene Konzentrationen (10 mM, 1 mM und 100 μ M EdU) getestet.



Abbildung 6: EdU-Injektionsmethoden; Links: Methode mit 2 Fäden durch den Knoten, auf dem die Ähre sitzt; Rechts: Injektion mit Spritze und Kanüle in den Halm, in dem die Ähre sitzt.

Fixierungslösung:

75 % Ethanol (96 %)
25 % Essigsäure

1xPBS: Für 1 Liter:

8,00 g NaCl
0,20 g KCl
1,44 g Na_2HPO_4
0,24 g KH_2PO_4
pH 7,4
auffüllen zu 1 Liter mit ddH₂O

2.3 Behandlung der Gerste mit Zebularin und 5-Azacytidin

Zebularin (Sigma Aldrich) bzw. 5-Azacytidin (Sigma Aldrich) wurde mit einer Spritze in die Gerstenpflanzen injiziert. Daneben wurden Fäden, deren Enden in ein Röhrchen mit Zebularin-Lösung gesteckt wurden (Abbildung 6), durch den Knoten, auf welchem sich die Ähre befindet, geführt. Die Lösung wurde möglichst vor der meiotischen DNA-Replikation in die Pflanze injiziert, damit Zebularin während dieser Replikation in die DNA eingebaut werden konnte. Von Zebularin wurde eine 10 mM Stocklösung hergestellt, wobei Zebularin in Wasser gelöst wurde. Zu Beginn wurden verschiedene Konzentrationen von Zebularin in 1xPBS verdünnt getestet (10 µM, 100 µM, 1mM, 10 mM). Zusätzlich wurden verschiedene Zusätze zu der 1 mM Zebularin-Lösung getestet, wobei es für alle angewandten Komponenten eine Kontrolle gab. Die Zugabe von Tween 20 sollte die Permeabilität erhöhen, sodass die Chemikalie besser in die Zellen gelangen kann. Durch die Zugabe von EdU sollte eine Überprüfung des richtigen Injektionszeitpunktes möglich sein. Die behandelten Pflanzen wurden etwa 72 Stunden nach der Injektion fixiert. Wenn die Pflanzen nach dieser Zeit noch sehr klein waren wurden die Ähren nach längerer Zeit (bis zu 168 Stunden) nach der Injektion fixiert. Als Kontrolle wurden Pflanzen nur mit 1xPBS behandelt. Diese verschiedenen Behandlungen wurden in drei voneinander zeitlich unabhängigen Versuchen durchgeführt (Tabelle 2,

Tabelle 3, Tabelle 4). In dritten Versuch wurde ein Teil der behandelten Pflanzen nicht fixiert, um zu überprüfen, ob in diesen Ähren Samen gebildet werden.

Tabelle 2: Angewandte Lösungen im ersten Versuch.

Komponenten	Methode
1 mM Zebularin + 1 mM EdU in 1xPBS	Faden
100 µM Zebularin + 1 mM EdU in 1xPBS	Faden
10 µM Zebularin + 1 mM in 1xPBS	Faden
1 mM EdU in 1xPBS (Kontrolle)	Faden

Tabelle 3: Angewandte Lösungen im zweiten Versuch

Komponenten	Methode
10 mM Zebularin in 1xPBS	Injektion
1 mM Zebularin + 1 mM EdU in 1xPBS	Injektion
100 µM Zebularin + 1mM EdU in 1xPBS	Injektion
Kontrolle: Keine Injektion	-

Tabelle 4: Angewandte Lösungen im dritten Versuch

Komponenten	Methode
1 mM Zebularin + 1 mM EdU + 5 % Tween 20 in 1xPBS	Injektion
1 mM Zebularin in 1xPBS	Injektion
1 mM Zebularin + 5 % Tween 20 in 1xPBS	Injektion
1,64 mM 5-Aza + 1 mM EdU + 5 % Tween 20 in 1xPBS	Injektion
5 % Tween 20 in 1xPBS	Injektion
1 mM EdU + 5 % Tween 20 in 1xPBS	Injektion
1xPBS	Injektion
Kontrolle: Keine Injektion	-

2.4 Herstellung von Objektträgern mit Gerstenantheren für zytologische Studien

Die Zellkerne von Gerstenantheren wurden für zytologische Analysen auf einem Objektträger fixiert. Dafür wurden die fixierten Antheren nochmals in frische Fixierungslösung gegeben. Danach wurden sie mit 0,01 M Citratpuffer zwei bis drei Mal für jeweils ungefähr 5 Minuten gewaschen. Dann wurden die Antheren mit einer Lösung mit Verdauungsenzymen bei 37 °C für etwa 45 Minuten behandelt. Nach den 45 Minuten wurde die Enzymlösung durch 0,01 M Citratpuffer ersetzt. Die Reaktion wurde auf Eis abgestoppt. Die verdauten Antheren wurden auf dem Objektträger in einem Tropfen Citratpuffer mit einem Messingstab aufgeschlossen. Dann wurde 60%ige Essigsäure auf den Objektträger gegeben. Dieser wurde danach zur Fixierung der Zellkerne für 30 Sekunden auf einen 45 °C warmen Heizblock gelegt. Dabei wurden die Zellkerne durch bewegen des Tropfens auf dem Objektträger verteilt. Danach wurde kalte Fixierungslösung auf den Objektträger gegeben. Der Objektträger wurde dann vorsichtig mit einem Fön getrocknet. Es wurde danach stufenweise für jeweils zwei Minuten in Ethanol dehydriert (70 %, 85 %, 100 %). Nach der Trocknung der Objektträger wurde DAPI in Vectashield auf den Objektträger gegeben und mit einem Deckgläschen abgedeckt.

0,01 M Citratpuffer:

444 µl 0,1 M Citrat
 566 µl 0,1 M Natriumcitrat
 9 ml ddH₂O

Fixierungslösung:

75 % Ethanol (96 %)
 25 % Essigsäure

Enzymmix:

333 µl Aliquot:

1% Cellulase
1% Pektolyase
in 0,01 M Citratpuffer pH 4,5

Gebrauchslösung: zusetzen von 666 µl 0,01 M Citratpuffer zum Aliquot

2.5 EdU Detektion

Das in die DNA eingebaute EdU kann mittels einer chemischen Reaktion detektiert werden, wobei EdU fluoreszenzmarkiert wird. Diese Fluoreszenz kann zytologisch am Fluoreszenzmikroskop registriert werden. Vor dieser chemischen Reaktion wurden die Zellen von den gesammelten Antheren auf einem Objektträger präpariert. Nach der Fixierung und Trocknung mit dem Fön konnte die chemische Reaktion zur Fluoreszenzmarkierung von EdU durchgeführt werden. Vor der eigentlichen Reaktion wurden die Objektträger für 15 Minuten in 1x PBS mit 0,1 % Triton x-100 gewaschen. Diese wurden dann noch zwei Mal in 1x PBS gewaschen. Danach wurde das Gemisch für die chemische Reaktion vorbereitet. 40 µl Detektionslösung wurde auf einen Objektträger gegeben und mit einem Stück Parafilm abgedeckt (Tabelle 5). Dies inkubierte für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen. Die Lösung wurde in 1x PBS wieder vom Objektträger entfernt. Nach dem Waschen wurde DAPI in Vectashield auf den Objektträger gegeben und dann mit einem Deckgläschen abgedeckt.

Tabelle 5: Reaktionsansatz Detektionslösung EdU Click- 488 (Carl Roth)

Komponente	Volumen
Deionisiertes Wasser	379 µl
Reaktionspuffer (10x)	50 µl
Katalysatorlösung	20 µl
6-FAM-Azid (10 mM)	1 µl
Zusatzpuffer (10x)	50 µl
Gesamtvolumen	500 µl

2.6 Genotypisierung mittels allelspezifischer quantitativer PCR

2.6.1 Design von Primern und Sonden

Durch Primer mit jeweiligen Sonden für SNPs soll festgestellt werden, ob die Sequenz von der Gerstenvarietät Morex oder Barke stammt. In den untersuchten SNPs enthält die DNA von Morex ein Adenin und die von Barke ein Guanin. Es wurde pro Primerpaar je eine allel-spezifische Sonde für Morex und Barke designt. In dieser Arbeit wurden zwei Primerpaare mit Sonden (Assay 1 und Assay 28) verwendet (Anhang 1). Die Zielsequenzen befanden sich auf dem Gerstenchromosom 3H in verschiedenen Regionen, um damit das Intervall zwischen den Primerpaaren auf

Rekombinationsereignisse zu überprüfen. Die Marker sind auf verschiedenen Chromosomenarmen. Das Intervall schließt einen rekombinationsarmen Bereich ein (Abbildung 7). Die Sonden beinhalten unterschiedliche Fluorophore, die durch das Binden der Sonde detektierbar werden. Die PCR wurde mit einer Echtzeit PCR-Maschine durchgeführt, wobei während der ganzen Zeit die Fluoreszenzintensität gemessen wurde.

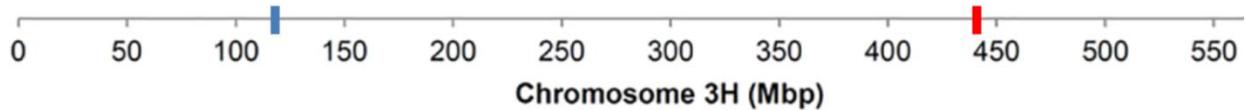


Abbildung 7: Positionen der getesteten Fluoreszenzmarker gezeigt als vertikale Striche entlang des Gerstenchromosoms 3H. (Rot) Assay 1 (Blau) Assay 28

Die Primer und Sonden wurden von der Firma Eurofins Genomics© synthetisiert. Die Primer haben eine Schmelztemperatur zwischen 55,3 °C und 59,4 °C. Der GC-Gehalt liegt bei den Primern für Assay 1 bei 45 % und bei Assay 28 bei etwa 55 %.

Die Sonden enthalten einen Quencher, durch den die Fluoreszenz reversibel unterdrückt wird bis die Sonden binden und dieser durch die Polymerase abgetrennt wird. Die Schmelztemperaturen der Sonden liegen zwischen 60,7 °C und 62,7 °C und sind somit höher als die der Primer. Der GC-Gehalt liegt zwischen 35,7 % und 39,7 %. Zu beachten war jedoch, dass ein G am 5'-Ende vermieden wird, um ein quenching des Fluorophors zu verhindern.

2.6.2 Validierung der quantitativen Echtzeit-PCR

Zuerst wurden die Sonden mit dem dazugehörigem Primerpaar einzeln getestet. Der nächste Ansatz war, die beiden Sonden, die zu einem Primerpaar gehören, zusammen zu testen. Danach wurden beide Sonden und beide Primerpaare pro Reaktion angewendet (Abbildung 8). Nachdem dies erfolgreich war, wurden die Primer und Sonden bei verschiedenen DNA-Konzentrationen getestet, wonach dann das Reaktionsvolumen von 10 µl auf 2 µl reduziert wurde (Tabelle 7). Nachdem die Tests mit genomischer DNA erfolgreich waren, wurde die PCR mit den beiden Sonden und den 4 Primern mit Blattkernen von den Varietäten Barke und Morex und den Pollen von F1 Hybriden (Morex x Barke) getestet. Zur Kontrolle wurden 100 Blattkerne und 10 Blattkerne der beiden Varietäten durchflusszytometrisch in getrennte Reaktionsgefäße einer PCR-Platte sortiert. Weiterhin wurden einzelne Blatt- und Pollenkerne in die Reaktionsgefäße der Platte sortiert. Dabei wurde das PCR Programm (Tabelle 6) verändert: Die Anzahl der Zyklen wurde von 55 auf 75 erhöht. Die folgenden Versuche wurden mit einer Anzahl von 55 Zyklen bei der Fluoreszenz-PCR durchgeführt. Es wurde auch getestet, ob es einen Unterschied zwischen den vegetativen und generativen Pollenkernen gibt. Die Fraktionen der unterschiedlichen Pollenkerne unterscheiden sich am

Durchflusszytometer durch einen unterschiedlichen Streulichtwert, wobei die vegetativen Pollenkerne einen höheren Streulichtwert haben.

Tabelle 6: Thermocycler Programm für die Fluoreszenz-PCR

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [min]	Wiederholungen
Polymeraseaktivierung	95	03:00	
Amplifikation			55/ 75
Denaturierung	95	00:15	
Annealing/Elongation	60	01:00	
Kühlung	4		

Tabelle 7: Reaktionsansatz Fluoreszenz-PCR

Komponenten	Endkonzentration
PrimeTime® Gene Expression Master Mix (2x)	1x
Vorwärtsprimer Assay1	0,4 µM
Rückwärtsprimer Assay1	0,4 µM
Vorwärtsprimer Assay28	0,4 µM
Rückwärtsprimer Assay28	0,4 µM
Sonde Assay1-A	0,2 µM
Sonde Assay1-G	0,2 µM
Sonde Assay28-A	0,2 µM
Sonde Assay28-G	0,2 µM
DNA Template	2000 (200; 20; 2; 0,2) pg/µl
H ₂ O	Auffüllen bis zum Gesamtvolumen

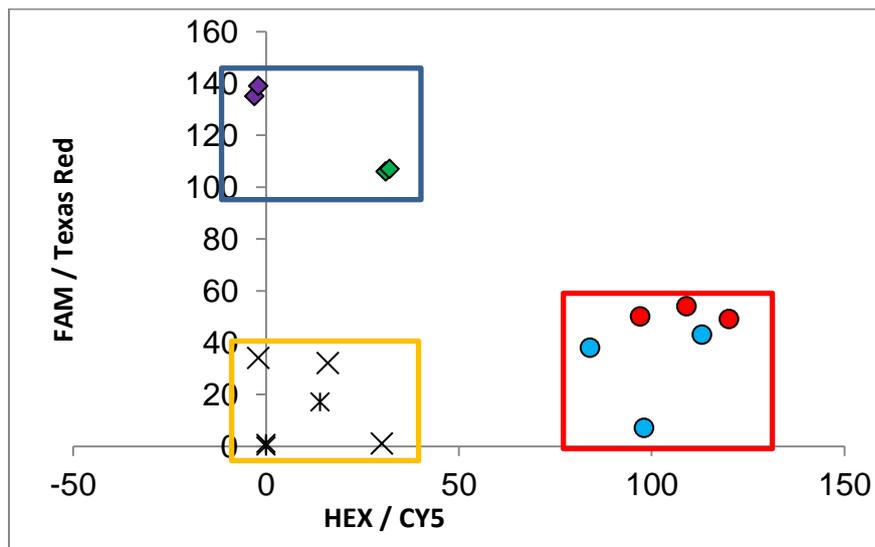


Abbildung 8: Darstellung der Ergebnisse der quantitativen Echtzeit-PCR. Die einzelnen Cluster in den Rahmen stehen für je eine Varietät: (Blau) Barke; (Rot) Morex; (Orange) Negativ Kontrollen. Die Punkte stehen für einzelne Reaktion, wobei die unterschiedlichen Farben in den Clustern für die verschiedenen Assays stehen: (Hellblau) Assay 1; (Rot) Assay 28; (Lila) Assay 1; (Grün) Assay 28

Zusätzlich wurden verschiedene Methoden zur Steigerung der Effizienz der PCR getestet. Dabei wurde ein Effekt von dem Einsatz von Proteinase K vor der PCR-Reaktion untersucht. Die Pollenkerne wurden bei dieser Methode in die Proteinase K-Lösung sortiert. Die Proteinase K wurde in Wasser gelöst. Die Effizienz der Fluoreszenz-PCR wurde hierbei mit einem Reaktionsvolumen von 10 µl und 2 µl getestet. Bei einem Reaktionsvolumen von 10 µl wurde in 1,6 µl und bei 2 µl in 0,5 µl Proteinase K-Lösung sortiert. Die sortierten Pollenkerne wurden für eine Stunde mit der Proteinase K bei 37 °C behandelt. Danach wurde die Proteinase K bei 95 °C für 15 Minuten denaturiert. Anschließend wurde die Fluoreszenz-PCR durchgeführt (Tabelle 8).

Tabelle 8: Reaktionsansatz Fluoreszenz-PCR mit Proteinase K-Behandlung

Komponenten	Endkonzentration
Proteinase K (Roche)	0,5 µg/ml
PrimeTime® Gene Expression Master Mix (2x)	1x
Vorwärtsprimer Assay1	0,4 µM
Rückwärtsprimer Assay1	0,4 µM
Vorwärtsprimer Assay28	0,4 µM
Rückwärtsprimer Assay28	0,4 µM
Sonde Assay1-A	0,2 µM
Sonde Assay1-G	0,2 µM
Sonde Assay28-A	0,2 µM
Sonde Assay28-G	0,2 µM
H ₂ O	Auffüllen bis zum Gesamtvolumen

Eine weitere getestete Methode war eine vorhergehende Hitzebehandlung in einer Mikrowelle bei 800 Watt für 40 Sekunden mit anschließender Behandlung mit Proteinase K. Dabei wurden die Pollenkerne in 1 µl Wasser sortiert. Die 1,6 µl Proteinase K-Lösung wurde nach der Mikrowellenbehandlung dazugegeben. Dies inkubierte bei 37 °C für eine Stunde. Nach dieser Stunde wurde die Proteinase K bei 95 °C für 15 Minuten inaktiviert. Danach wurde die Fluoreszenz-PCR durchgeführt (Tabelle 9).

Tabelle 9: Reaktionsansatz Fluoreszenz-PCR mit Mikrowellen- und Proteinase K-Behandlung

Komponenten	Endkonzentration/-menge
H ₂ O	1 µl
Proteinase K (Roche)	0,31 µg/ml
PrimeTime® Gene Expression Master Mix (2x)	1x
Vorwärtsprimer Assay1	0,4 µM
Rückwärtsprimer Assay1	0,4 µM
Vorwärtsprimer Assay28	0,4 µM
Rückwärtsprimer Assay28	0,4 µM
Sonde Assay1-A	0,2 µM
Sonde Assay1-G	0,2 µM
Sonde Assay28-A	0,2 µM
Sonde Assay28-G	0,2 µM
Gesamtvolumen	10 µl

Zusätzlich wurde getestet, ob durch eine vorausgehende PEP (primer-extension preamplification)-PCR die Effizienz der Fluoreszenz-PCR gesteigert werden kann. Dafür wird eine Sammlung von 15-Basen-Oligonukleotiden verwendet, in denen jede der 4 Basen an einer beliebigen Position vorhanden sein kann. Es sind etwa 10^9 verschiedene Primer möglich, wodurch Abschnitte des Genoms zufällig amplifiziert werden können (Zhang et al. 1992). Die Pollenkerne wurden in 1 µl Proteinase K-Lösung sortiert (Tabelle 10). Die sortierten Pollenkerne wurden eine Stunde bei 37 °C in der Proteinase K-Lösung behandelt. Danach wurde die Proteinase K bei 95 °C für 15 Minuten inaktiviert. Nach der anschließenden PEP-PCR (Tabelle 10, Tabelle 11) wurde die Fluoreszenz-PCR durchgeführt (Tabelle 12).

Tabelle 10: Reaktionsansatz PEP-PCR

Komponenten	Endkonzentration
Proteinase K (Roche)	0,5 µg/ml
PCR Puffer (Qiagen 10x)	1x
dNTPs (Qiagen)	0,2 µM
PEP-Primer	10 µM
Taq Polymerase (Quiagen)	1 U (0,2 U)
H ₂ O	Auffüllen bis zum Gesamtvolumen
Gesamtvolumen	2,6 µl

Tabelle 11: Thermocycler Programm für die PEP-PCR

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [min]	Wiederholungen
Polymeraseaktivierung	95	05:00	
Amplifikation			20
Denaturierung	95	00:30	
Annealing	37	02:00	
	37-55	Erhöhung über 3:00	
Elongation	55	4:00	
Kühlung	4		

Tabelle 12: Reaktionsansatz Fluoreszenz-PCR mit Proteinase K-Behandlung und vorhergehender PEP-PCR

Komponenten	Endkonzentration/-menge
PEP-PCR-Reaktionsansatz	2,6 µl
PrimeTime® Gene Expression Master Mix (2x)	1x
Vorwärtsprimer Assay1	0,4 µM
Rückwärtsprimer Assay1	0,4 µM
Vorwärtsprimer Assay28	0,4 µM
Rückwärtsprimer Assay28	0,4 µM
Sonde Assay1-A	0,2 µM
Sonde Assay1-G	0,2 µM
Sonde Assay28-A	0,2 µM
Sonde Assay28-G	0,2 µM
Gesamtvolumen	10 µl

2.6.3 Sortieren von individuellen Blatt- und Pollenkernen mittels Durchflusszytometrie

Zuerst wurden reife Antheren in einem 1,5 ml Röhrchen von etwa 10 Blüten von F1 Hybriden (Morex x Barke) gesammelt. Dann wurde etwa 1 ml Galbraith-Puffer dazugegeben. Dies wurde dann für ungefähr 30 Sekunden mit dem Vortexer gemischt. Dann wurden die Antheren auf einen 100 µm Filter (Sysmex-Partec) gegeben und die Pollensuspension durch den Filter in ein neues 1,5 ml Röhrchen gegeben. In diesem Schritt wurden die großen Verunreinigungen von den Pollen abgetrennt. Mit einem Stäbchen wurden die Antheren vorsichtig auf dem Filter gerieben. Die entstandene Pollenkörner Suspension wurde dann auf einen 10 µm Filter (Sysmex-Partec) gegeben, um die Pollenkörner aufzubrechen. Dafür wurden die Pollenkörner auf dem Filter mit dem Stäbchen sanft gerieben. Mit dem Durchfluss der entstanden ist werden die Pollenkerne durch den Filter in ein neues 1,5 ml Röhrchen gespült (Kron und Husband 2012). Die Suspension wurde vor dem Sortieren mit Propidiumiodid (50 µl/ml) angefärbt. Es wurde mit dem BD FACSAria IIu (BD Biosciences) Durchflusszytometer in eine 384 Reaktionsgefäße einer PCR-Platte sortiert. In den Reaktionsgefäßen waren entweder Wasser, Proteinase K-Lösung oder der Mastermix für die Fluoreszenz-PCR enthalten (Abbildung 9).

Galbraith Puffer:

45 mM MgCl₂
30 mM Natriumcitrat
20 mM MOPS (3-(N-Morpholino)propansulfonsäure)
0,1 % TritonX100
pH 7

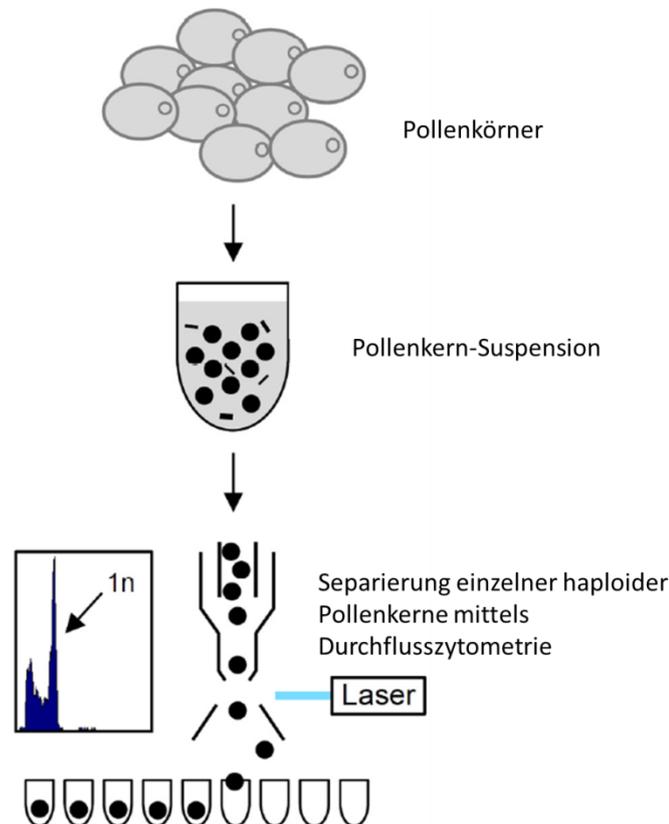


Abbildung 9: Schema für das Sortieren von einzelnen haploiden Pollenkernen mittels Durchflusszytometrie (Dreissig et al. 2015).

3 Ergebnisse

3.1 Behandlung mit EdU

Ziel der Versuche mit EdU war es, den Zeitpunkt der meiotischen DNA-Replikation vor der männlichen Meiose in den Antheren zu bestimmen, die Dauer der männlichen Meiose zu charakterisieren und diese mit morphologischen Merkmalen der Gerstentriebe zu korrelieren. EdU muss vor der S-Phase der Meiose injiziert werden, um in die DNA während der DNA-Replikation eingebaut werden zu können. Die Chemikalien, die anschließend verwendet werden sollen, müssen ebenso zu diesem Zeitpunkt in die Ähren gelangen. Zur Bestimmung dieses Zeitpunktes diente die sogenannte Zadoks Skala für die Wachstumsstadien von Getreiden als Orientierung (ZADOKS et al. 1974). Dabei dienten die Anordnung der Blätter, die Anzahl und Position der tastbaren Knoten und die Gesamtgröße des Triebes als Anhaltspunkte für die externe Bestimmung des Entwicklungsstadiums der Ähren. Bei der Injektion sollte die Ähre optimal eine Größe von etwa 1 cm

haben oder etwas kleiner sein. Dies ist in der Einteilung nach Zadoks etwa in den Stadien 31 und 32 der Fall (ZADOKS et al. 1974, Abbildung 21). Damit später bei den mit Chemikalien behandelten Ähren zytologisch eine Veränderung in der Chiasmata Anzahl und Verteilung entlang der Chromosomen bestimmt werden kann, ist es notwendig, die meiotischen Stadien Diakinese oder Metaphase I in den behandelten Ähren zu haben. Es zeigt sich, dass bei einer Größe von 1,7 cm bis etwa 2,9 cm die Wahrscheinlichkeit diese Stadien zu erhalten am höchsten ist, wobei in den größeren Ähren dann auch schon häufig in der Mitte junge Pollen zu finden sind. Die Stadien Diakinese und Metaphase I waren jedoch auch teilweise in der Spitze von deutlich größeren Ähren, bis etwa 4,8 cm, zu finden, wobei im Großteil der Ähre schon reife Pollen zu finden waren. Im unteren Teil und vor allem im oberen Teil der Ähre sind dann aber trotzdem noch jüngere meiotische Stadien zu finden, da die Meiose nicht in der ganzen Ähre synchron abläuft (Abbildung 10).

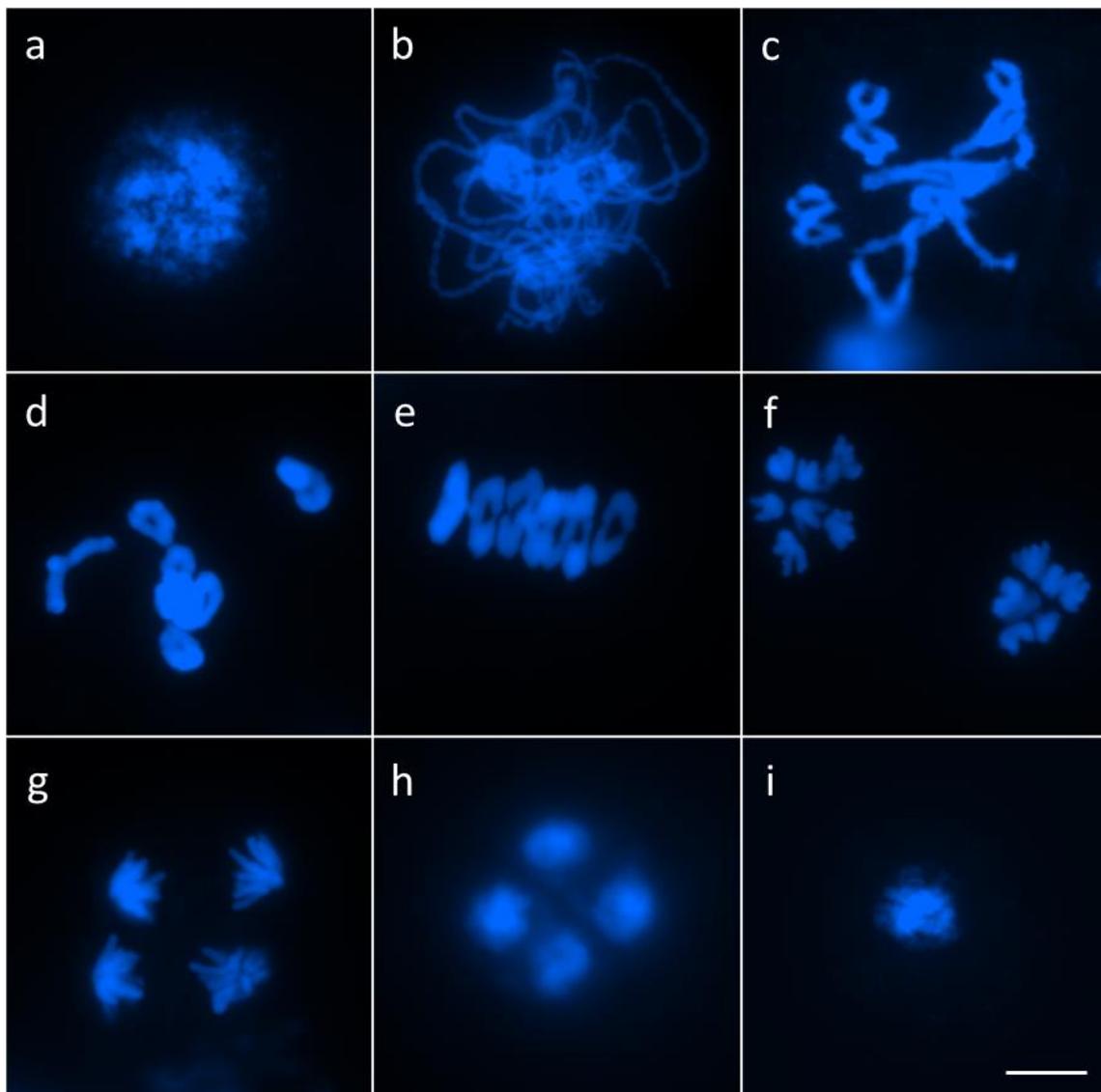


Abbildung 10: Ablauf der Meiose in Gerste. **(a)** Leptotän, **(b)** Pachytän, **(c)** Diplotän, **(d)** Diakinese, **(e)** Metaphase I, **(f)** Anaphase I, **(g)** Anaphase II, **(h)** Tetraden und **(i)** junger Pollen. Chromosomen wurden mit DAPI (blau) gefärbt. Skalierungsleiste entspricht einer Größe von 10 μm .

Zu Beginn wurden verschiedene Konzentrationen von EdU getestet. Begonnen wurde mit einer Konzentration von 10 mM, welche zuvor schon positive Ergebnisse lieferte hinsichtlich der Markierung meiotischer Gerstenchromosomen (Higgins 2013). Es sollte jedoch eine möglichst geringe Konzentration an EdU angewandt werden, um einen potentiellen Effekt auf die Meiose möglichst gering zu halten. Bei einer Konzentration von 100 μ M EdU waren in der Hälfte der damit behandelten Ähren keine markierten Zellen zu finden. In der anderen Hälfte war nur etwa 1 % der Zellen markiert. Die Effizienz der Injektionen nimmt mit steigender Konzentration zu. Bei 1 mM EdU waren in etwa 88 % der Fälle wenige Zellen, weniger als 10 %, markiert, in 12 % waren viele Zellen mit EdU markiert. Wird EdU in einer Konzentration von 10 mM injiziert, sind in 96 % der Fälle viele Zellen markiert gewesen. Bei den anderen 4 % waren wenige Zellen markiert. Es zeigt sich dadurch, dass die Injektion mit 10 mM am besten funktioniert, mit 1 mM aber auch gute Ergebnisse zu erreichen sind. Es wurden keine Defekte in der Meiose im Zusammenhang mit den angewandten EdU Konzentrationen festgestellt.

Es wurde vermutet, dass manche Bereiche in der Ähre das EdU besser aufnehmen als andere. Dieser Verdacht bestätigte sich jedoch nicht. Es sind zwar Unterschiede innerhalb einer Ähre hinsichtlich der EdU-Markierung festgestellt worden, jedoch variierte dies zwischen den Ähren. In manchen waren so zum Beispiel in der Spitze am meisten Zellen markiert, in anderen dann im unteren Teil der Ähre.

Um festzustellen, ob zum richtigen Zeitpunkt vor der meiotischen Replikation injiziert wurde und wie lange die Meiose unter den gegebenen Wachstumsbedingungen braucht, wurden die Ähren nach verschiedenen Zeiten fixiert. Nach 45 Stunden waren Leptotän bis Zygotän markiert, aber keine späteren Stadien. Pachytän war nach 47 Stunden stellenweise markiert. Dies war aber auch nach 54 Stunden der Fall. Nach etwa 69 Stunden waren meiotische Stadien bis zur Telophase II markiert. Dies war auch nach 72 Stunden der Fall. Zudem trat manchmal der Fall ein, dass spätere meiotische Stadien markiert waren, jedoch die früheren, wie Pachytän nicht. Daraus entwickelte sich die Fragestellung, ob mehrmaliges injizieren alle 24 Stunden bzw. 48 Stunden sinnvoll ist, um auszuschließen, dass es daran liegt, dass das EdU schon aufgebraucht wurde. Nach 121 Stunden waren mitotische Zellen markiert, aber keine meiotischen, trotz erneuter Injektion alle 24 Stunden. Bei einer erneuten Injektion alle 48 Stunden waren nach 144 Stunden Diakinese, Metaphase I, Anaphase I, Telophase I und junger Pollen mit EdU markiert. Pachytän und mitotische Zellen waren nicht markiert. Nach 168 Stunden, ebenfalls mit erneuter Injektion alle 48 Stunden, waren mitotische Zellen und junger Pollen markiert. Frühere meiotische Stadien waren nicht markiert. Eine Dauer von etwa 3 Tagen nach der Injektion reicht somit aus, um auch späte meiotische Stadien markiert zu erhalten, wenn zum richtigen Zeitpunkt injiziert wird.

Für eine kontinuierliche Behandlung mit der EdU-Lösung, oder um leichter nur einen Impuls zu geben, wurde eine andere Methode getestet, bei der zwei Fäden mit Hilfe einer Nadel durch den Knoten, unterhalb der Ähre, geführt wurden, wobei die Enden dieser Fäden in der EdU Lösung waren. Durch diese Methode wird eine kontinuierliche Aufnahme von EdU bzw. später der Chemikalie ermöglicht. Dadurch wird es ermöglicht, dass bei jeder nach dem durchführen der Fäden stattfindenden Replikation die Substanz vorhanden ist und somit in die DNA eingebaut werden kann bzw. Einfluss nehmen kann auf die epigenetische Modifizierung der replizierten DNA. Auch bei dieser Methode wurden verschiedene EdU-Konzentrationen getestet, da bei dieser Methode mit 10 mM im ersten Versuch Mikrokerne aufgetreten sind. Mikrokerne entstehen aus Chromosomen-Bruchstücken, die aufgrund von Strukturänderungen der Chromosomen entstehen und einen vom Zellkern getrennten Kern bilden. Bei einer Konzentration von 100 μ M EdU kam es in keiner Ähre zur Markierung mit EdU. Bei einer Konzentration von 1 mM EdU waren in 18 % der Fälle keine Zellen, in 64 % wenige Zellen und in 18 % viele Zellen markiert. Die Erfolgsrate von markierten Zellen war bei 10 mM etwas geringer. Hier zeigten 33 % der Ähren keine Markierung mit EdU, jedoch zeigte sich in 50 % der Ähren eine Markierung von vielen Zellen. 1 mM und 10 mM weisen relativ ähnliche Erfolgsraten auf bei der Markierung von somatischen Zellkernen.

In einem Teil der Ähren waren zwar somatische Zellkerne, jedoch keine meiotischen Zellkerne markiert. Bei einer Konzentration von 100 μ M EdU wurden bei beiden Methoden keine markierten meiotischen Zellkerne gefunden. In 75 % der Fälle, wo somatische Zellen markiert waren, waren auch meiotische Zellen markiert bei der Injektion von 1 mM EdU. Bei der Methode mit den Fäden waren es nur etwas mehr als 30 %, in denen meiotische Zellen markiert waren. Bei 10 mM wurden bei der einmaligen Injektion in 93 % der Ähren, in denen somatische Zellkerne markiert waren, meiotische Zellen durch EdU markiert. Die andere Methode lieferte keine markierten meiotischen Zellen bei dieser Konzentration. Bei der erneuten Injektion von EdU nach 24 Stunden bzw. 48 Stunden waren bei einer Konzentration von 10 mM EdU in 36 % der Ähren, in denen somatische Zellkerne markiert waren, meiotische Zellkerne markiert (Abbildung 11).

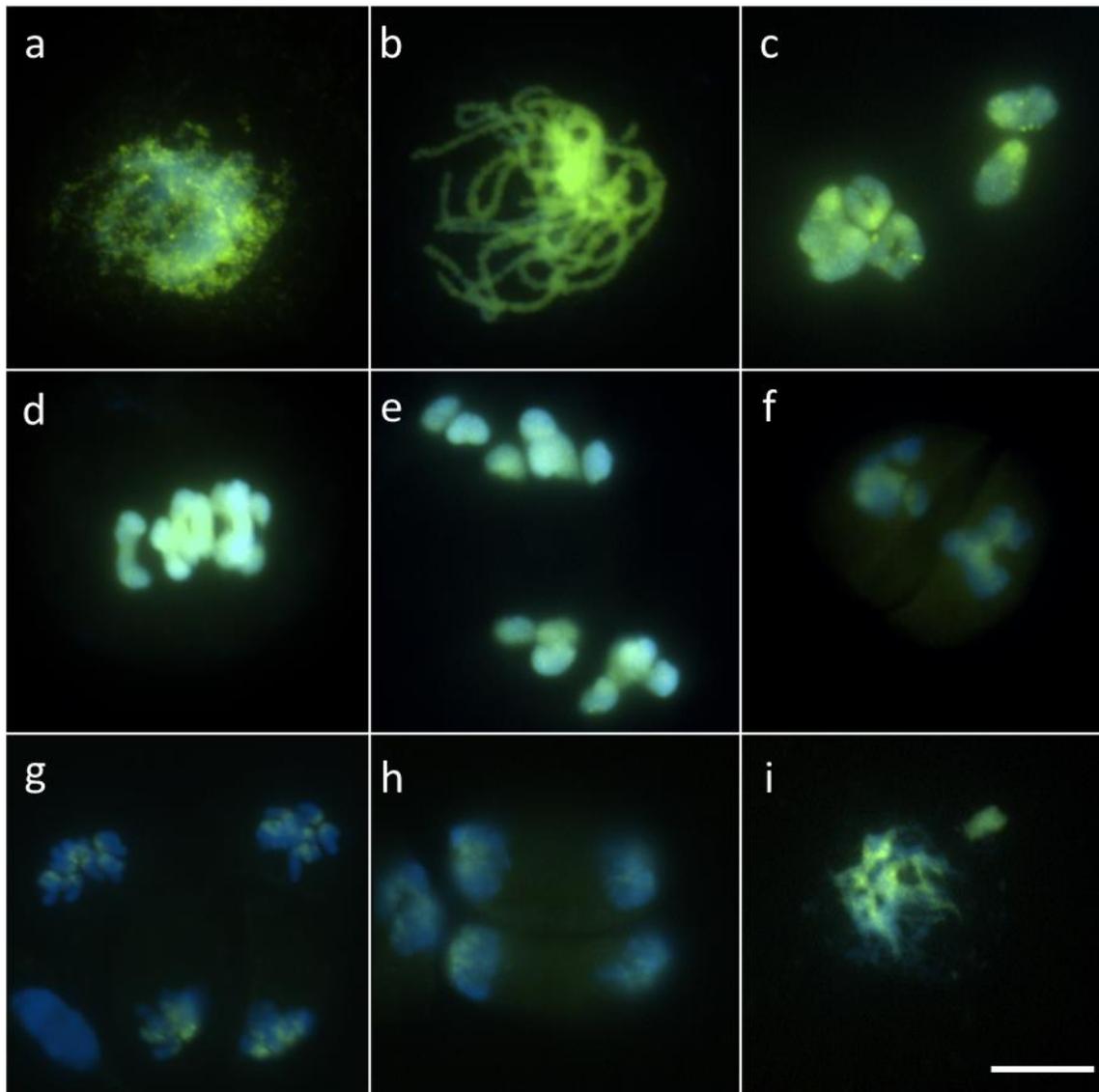


Abbildung 11: Meiotische Chromosomen der Gerste mit EdU (grün) markiert und mit DAPI (blau) angefärbt. **(a)** Leptotän-Zygotän, **(b)** Pachytän, **(c)** Diakinese, **(d)** Metaphase I, **(e)** Anaphase I, **(f)** Prophase II - Metaphase II, **(g)** Anaphase 2, **(h)** Telophase II **(i)** und junger Pollen. Skalierungsleiste entspricht einer Größe von 10 µm.

In vielen Fällen sind die meiotischen Stadien nur teilweise mit EdU markiert. Dies tritt vor allem in der Diakinese und den späteren meiotischen Stadien auf. In den Chromatiden sind dann hauptsächlich die spät replizierenden heterochromatischen zentromerischen Bereiche markiert. Die distalen Bereiche der Chromosomen, in denen die Chiasmata auftreten, werden früh repliziert. Diese sind in den meisten Fällen nicht mit EdU markiert (Abbildung 12).

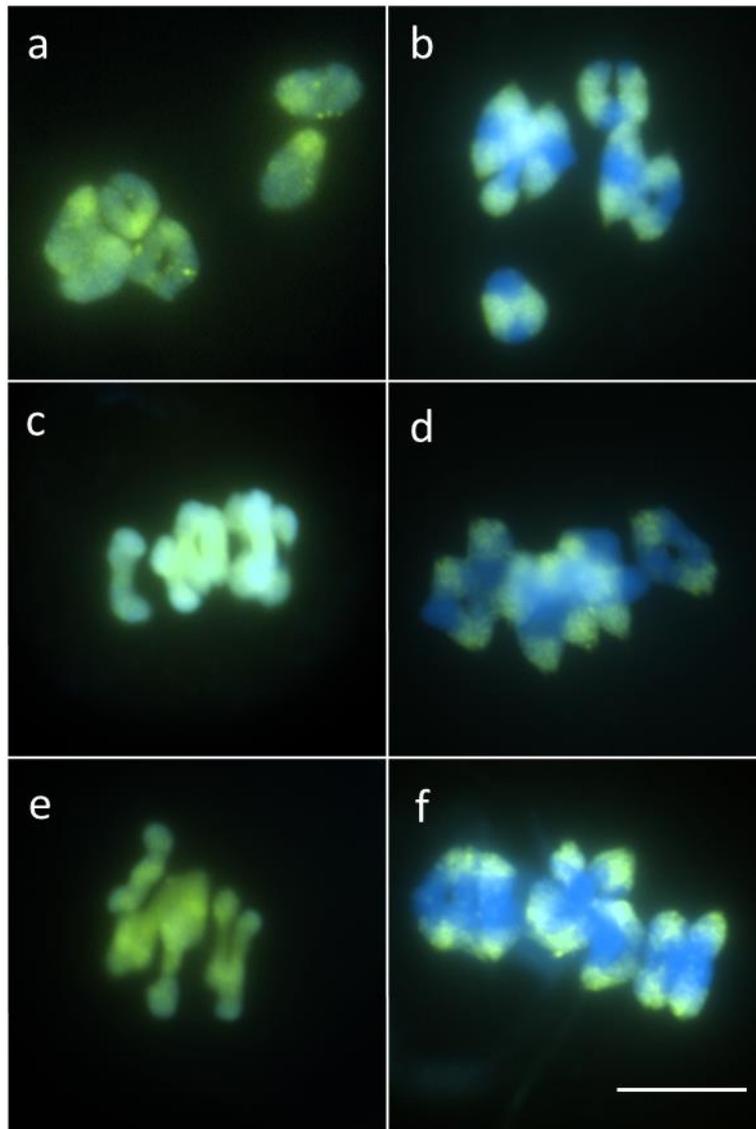


Abbildung 12: Gegenüberstellung von komplett (a, c, e) markierter und nur teilweise (b, d, f) mit EdU (grün) markierter DNA in meiotischen Chromosomen der Gerste. **(a)** Diakinese **(b, c)** Metaphase I. Chromosomen wurden mit DAPI (blau) gefärbt. Skalierungsleiste entspricht einer Größe von 10 µm.

3.2 Behandlung mit Zebularin und 5-Azacytidin

Das Ziel der Anwendung von den DNA-Methylierungsinhibitoren Zebularin und 5-Azacytidin, war es die Anzahl an Crossovers zu erhöhen und/oder die Verteilung dieser zu verändern. Die Arbeitshypothese war, dass Gene, die in stark methylierten heterochromatischen perizentromerischen Regionen im Gerstengenom liegen aufgrund einer Inhibitor-vermittelten Hypomethylierung dieser, erhöhte Rekombinationsraten zeigen, wodurch somit die genetische Diversität für Züchtungsprogramme erhöht werden kann. In den ersten beiden Versuchen wurde nur Zebularin getestet. Die Zebularin-Lösung wurde zur 1 mM EdU Kontrolle hinzugefügt. Durch EdU sollte gewährleistet werden, dass zum richtigen Zeitpunkt injiziert wurde (vor bzw. während der meiotischen S-Phase) anhand EdU-positiver meiotischer Zellkerne. Es zeigt sich, dass die EdU-Markierung möglicherweise nicht verlässlich ist, da mögliche Anomalien, welche nicht in den

Kontrollen sichtbar sind, in vielen nicht EdU-markierten Zellen erkennbar sind. Die beobachteten Effekte durch Zebularin könnten jedoch auf Effekten außerhalb der meiotischen S-Phase beruhen. Aufgrund dessen wurde die EdU-Markierung der meiotischen Zellen in der folgenden Auswertung nicht berücksichtigt.

Im ersten Versuch wurde die Behandlungslösung mittels eines Fadens in die Pflanze injiziert. Die EdU-Kontrolle zeigt in etwa 3 % der Zellen Fragmente. Bei der Behandlung mit 1 mM Zebularin ist in einer Zelle von 62 eine Anomalie erkennbar. Durch den Vergleich mit der Kontrolle ist diese Anomalie vermutlich nicht auf Zebularin zurückzuführen. In den Diakinesen und Metaphasen I von den mit 100 μ M und 10 μ M Zebularin behandelten Ähren, sind in etwa 30 % der Zellen Anomalien erkennbar. Diese sind vermutlich durch Zebularin entstanden, da der Wert deutlich über der Rate in der Kontrolle liegt (Tabelle 13).

In einem zweiten Versuch wurden die Zebularin-Lösungen mit einer Spritze in die Pflanzen injiziert, da diese Methode in den vorherigen Versuchen mit EdU eine höhere Erfolgsrate aufweist als die Injektionsmethode mit dem Faden. Als Kontrolle diente in diesem Versuch eine Ähre, in die nicht injiziert wurde. In der Kontrolle sind keine offensichtlichen Anomalien erkennbar. Bei der mit 1 mM Zebularin behandelten Ähre weisen 3 von 36 Zellen Anomalien auf. Diese Rate ist sehr gering und nicht deutlich höher als in der EdU-Kontrolle aus dem ersten Versuch. Die Defekte sind somit vermutlich nicht durch Zebularin entstanden. Die negativen Ergebnisse der beiden Ähren, die mit 1 mM Zebularin behandelt wurden, beruhen vermutlich auf dem falschen Injektionszeitpunkt der Chemikalie und nicht auf der erhöhten Zebularinkonzentration. Etwa 46 % der Diakinesen und Metaphasen I der mit 100 μ M behandelten Ähre weisen Defekt auf. Diese Defekte sind wahrscheinlich auf Zebularin zurückzuführen (Tabelle 13).

Tabelle 13: Rate an Anomalien in Diakinese bzw. Metaphase I Zellkernen der Gerste in behandelten Pflanzen aus den ersten beiden Versuchen.

Behandlung	Versuch 1 Faden Anomalien [% (N)]	Versuch 2 Injektion Anomalien [% (N)]
1 mM Zebularin + 1 mM EdU in 1xPBS	1,61 (1/62)	8,33 (3/36)
100 μ M Zebularin + 1 mM EdU in 1xPBS	32,50 (13/40)	46,43 (13/28)
10 μ M Zebularin + 1 mM EdU in 1xPBS	28,38 (21/53)	-
Kontrolle 1 mM EdU in 1xPBS	2,94 (2/68)	-

In dem ersten Versuch sind in den Diakinesen und Metaphasen I bei der Kontrolle (nur EdU) und bei der Behandlung mit 1 mM Zebularin in einem geringen Prozentsatz der meiotischen Zellen Anomalien zu erkennen (Abbildung 13 a, c, j-l). In einer Metaphase von einer mit 1 mM Zebularin behandelten Ähre sind mehr als 7 Chromosomen zu erkennen. Vermutlich fand in dieser Zelle keine

Rekombination zwischen zwei homologen Chromosomen statt, was auf einen Verlust des obligatorischen Crossovers hindeutet, sodass zwei Univalente anstatt ein Bivalent in der Metaphase I sichtbar sind (Abbildung 13 b). Dies ist auch in einer Diakinese bei einer Ähre von einer Pflanze, die mit 100 μM Zebularin behandelt wurde, der Fall (Abbildung 13 d). Bei dieser Ähre sind auch in vielen Zellen Fragmente sichtbar (Abbildung 13 e). In manchen Diakinesen dieser Ähre weisen die Chromosomen teilweise eine langgezogene Struktur und zusätzlich auch Fragmente auf (Abbildung 13 f). Die mit 10 μM behandelte Ähre weist in vielen Diakinesen und Metaphasen I ein Fragment auf (Abbildung 13 h, i).

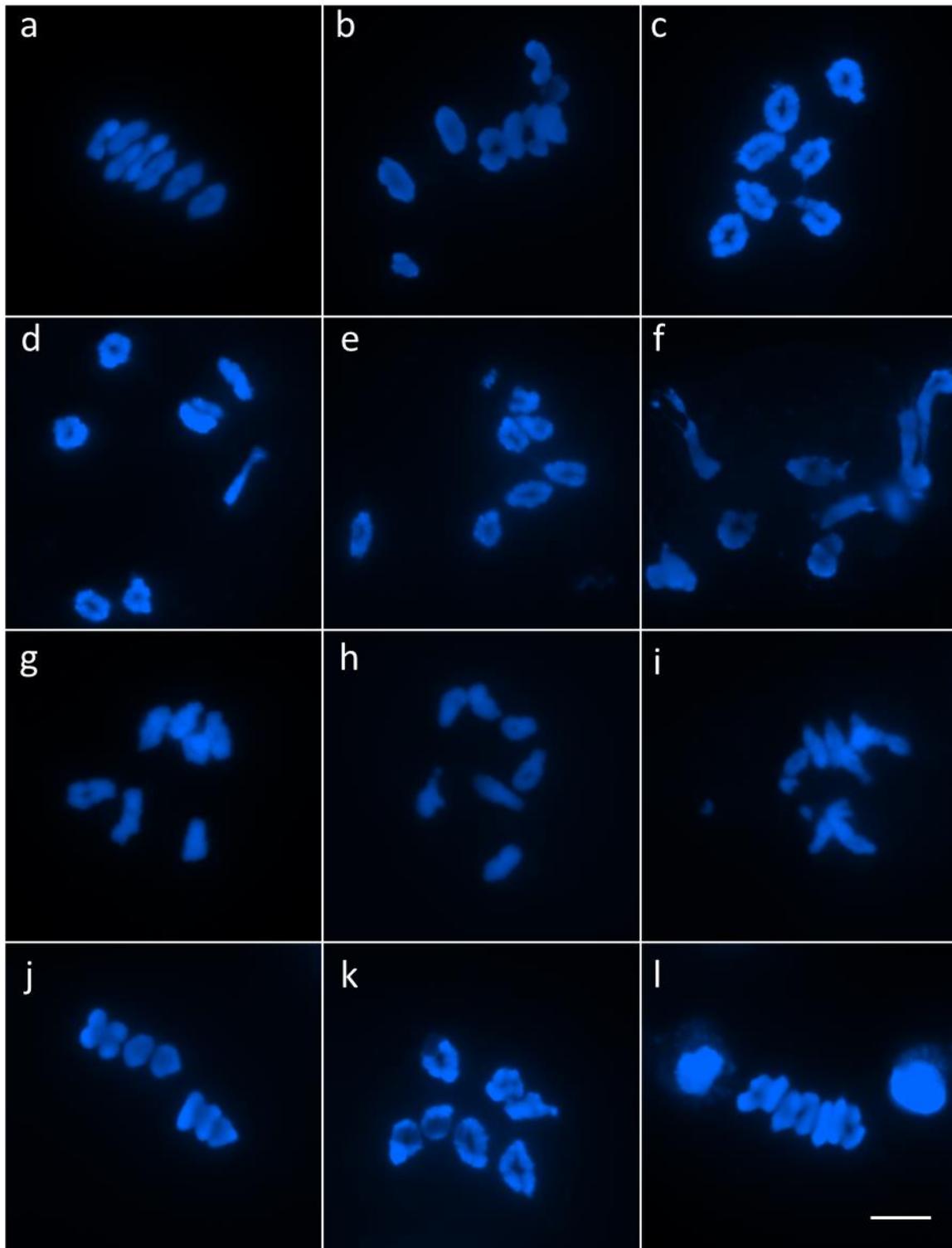


Abbildung 13: Diakinesen und Metaphasen I von mit Zebularin behandelten Ähren der Gerste aus Versuch 1. Die Chromosomen wurden mit DAPI (blau) angefärbt. **(a-c)** 1 mM Zebularin + 1 mM EdU in 1xPBS, **(d-f)** 100 µM Zebularin + 1 mM EdU in 1xPBS, **(g-i)** 10 µM Zebularin + 1 mM EdU in 1xPBS und **(j-l)** Kontrolle: 1 mM EdU in 1xPBS. Skalierungsleiste entspricht einer Größe von 10 µm.

Im zweiten Versuch wurden die Chemikalien-Lösungen mit einer Spritze injiziert. Es wurde eine höhere Konzentration von 10 mM Zebularin angewandt, um zu prüfen, ob dieses zu einem stärkeren Effekt der Chemikalie führt. Die mit 10 mM Zebularin behandelten Ähren waren sehr klein und es

waren keine späteren Stadien als der Übergang vom Leptotän zum Zygotän in den Antheren zu finden. In diesem Stadium sind keine Fragmente oder andere offensichtliche Anomalien zu erkennen (Abbildung 14 a-c). In den Diakinesen und Metaphasen I einer Ähre, einer mit 1 mM Zebularin behandelten Gerstenpflanze, sind vornehmlich keine ungewöhnlichen Strukturen sichtbar. In einer Zelle sind jedoch drei Stab-Bivalente zu erkennen (Abbildung 14 e). In den Kontrollen und den meisten anderen Zellen ist typischerweise maximal ein Stab-Bivalent vorhanden. Der Rest der Bivalente bildet meist Ringstrukturen aus. In einer Diakinese sind die Bivalente sehr langgezogen, wobei es teilweise aussieht, als ob die homologen Chromosomen auch in den interstitiellen Chromosomenregionen verbunden sind. In der mit 100 μ M Zebularin behandelten Ähre sind mehr Anomalien erkennbar. In den Diakinesen und Metaphasen I sind häufig Chromosomen-Fragmente sichtbar. In diesen Zellkernen sieht es ebenfalls so aus, dass die Bivalente auch in den interstitiellen Bereichen physisch verknüpft sind (Abbildung 14 h, i). In der unbehandelten Kontrolle sind die Chromosomen nicht gut auf dem Objektträger verteilt, sodass keine einzelnen Chromosomen zu erkennen sind. Es sind jedoch keine Defekte oder Anomalien, wie zum Beispiel Fragmente sichtbar (Abbildung 14 j-l).

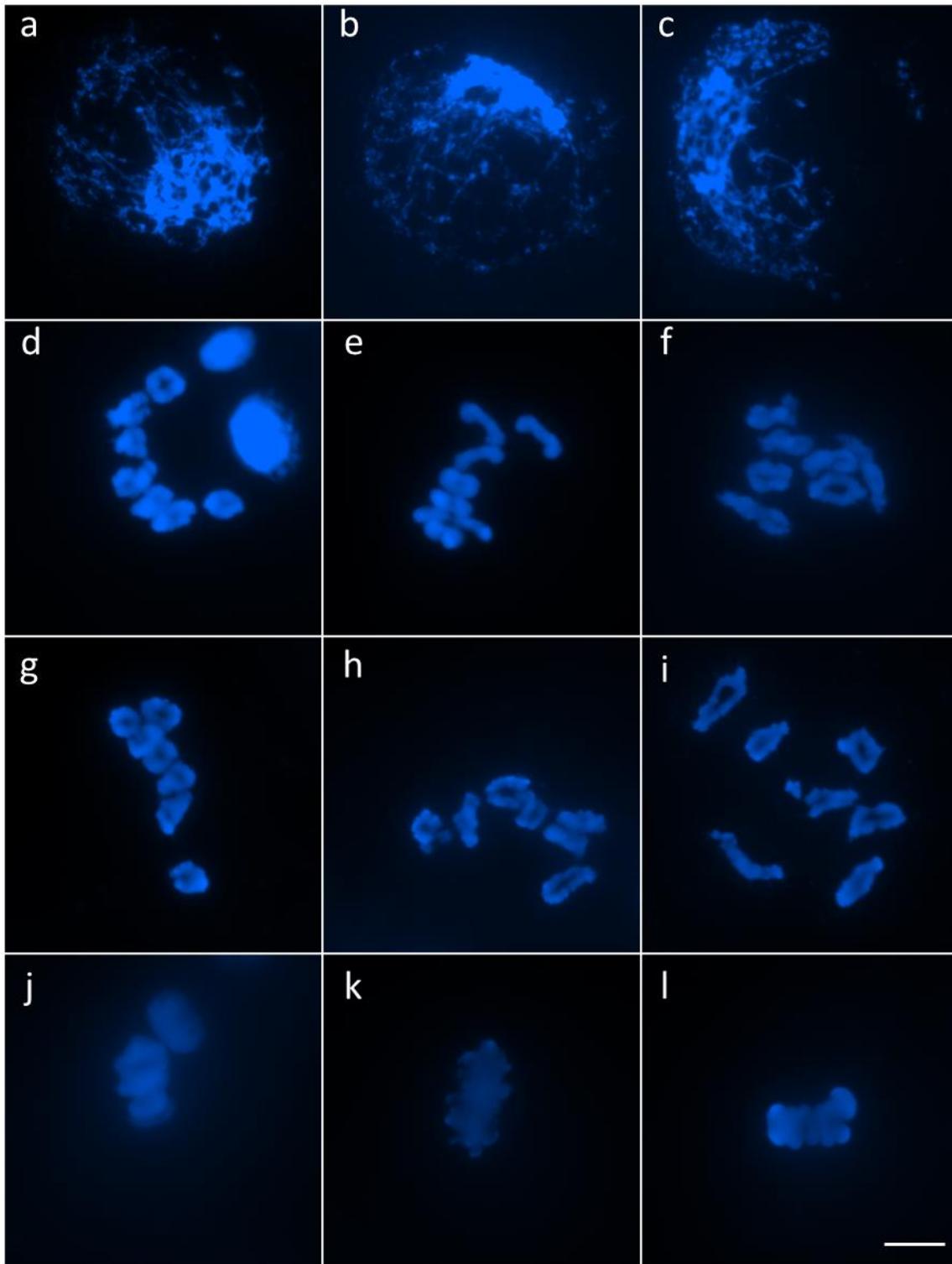


Abbildung 14: Meiotische Chromosomen von mit Zebularin behandelten Ähren der Gerste aus Versuch 2. Die Chromosomen wurden mit DAPI (blau) angefärbt. **(a-c)** 10 mM Zebularin in 1xPBS, **(d-f)** 1 mM Zebularin + 1 mM EdU in 1xPBS, **(g-i)** 100 μ M Zebularin + 1 mM EdU in 1xPBS und **(j-l)** Kontrolle ohne Injektion. Skalierungsleiste entspricht einer Größe von 10 μ m.

Im dritten Versuch wurde zusätzlich zu Zebularin auch 5-Azacytidin als DNA-Methylierungsinhibitor getestet. Zudem wurde einem Teil der Chemikalienlösungen 5 % Tween 20 hinzugefügt (Sinha und Helgason 1969), um möglicherweise die Permeabilität der Zellen zu erhöhen, sodass die Chemikalie

besser in die Antheren/Zellen der Ähre gelangen kann. Eine aussagekräftige Auswertung des Versuchs ist nicht möglich, da Defekte, die in behandelten Pflanzen zu sehen sind, ebenfalls in den Kontrollen auftreten. Als Kontrolle wurden unbehandelte Ähren und Ähren, die nur mit 1xPBS behandelt wurden, verwendet. In der Kontrolle mit 1xPBS sind in vielen Diakinesen und Metaphasen I Fragmente zu sehen (Abbildung 15 b, c), jedoch sind nicht alle Zellen dieser meiotischen Phasen betroffen (Abbildung 15 a). In der Kontrolle ohne eine Behandlung weisen alle Zellen Anomalien auf. Es sind Fragmente und langgezogene Chromosomen zu erkennen (Abbildung 15 d-f). Bei beiden Kontrollen sieht es in vielen Bivalenten aus, als ob die homologen Chromosomen auch über Crossover in interstitiellen Bereichen verbunden sind, was sich in den vorherigen Kontrollen nicht zeigte (Abbildung 13 j-l). Dieser Effekt ist wahrscheinlich auf zu hohe Temperaturen in dem Gewächshaus zurückzuführen, da die Klimatisierung während dieses Experiments ausgefallen ist.

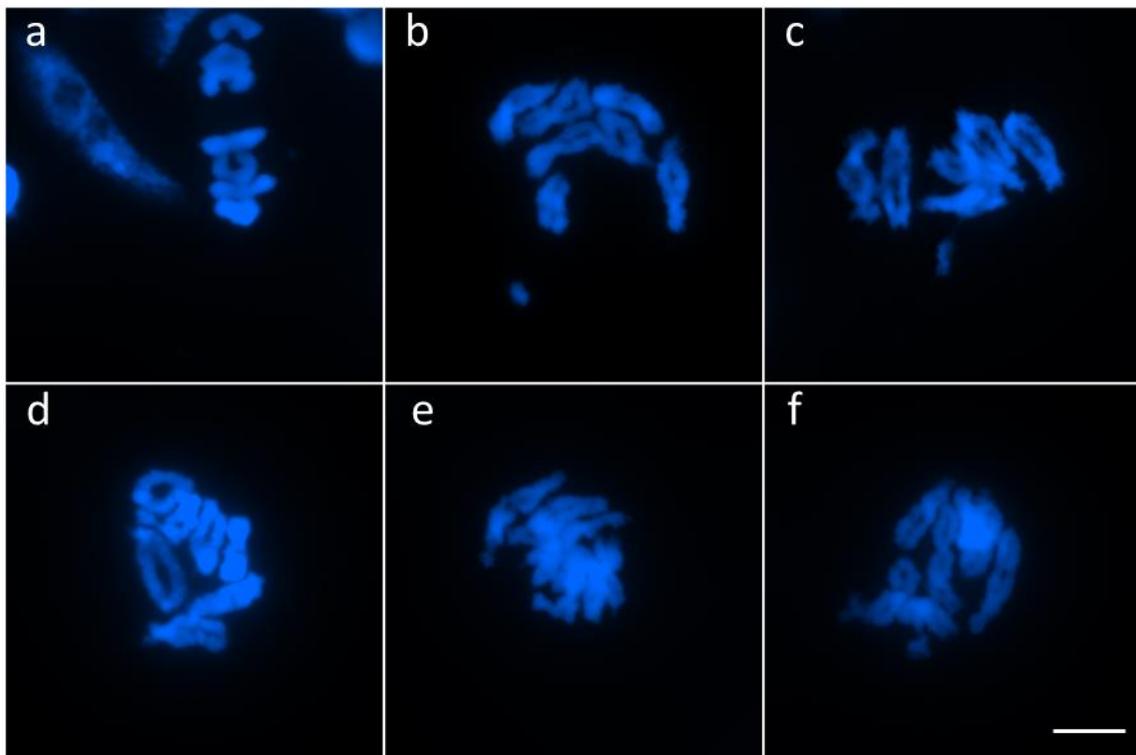


Abbildung 15: Diakinesen und Metaphasen I von Ähren der Kontrollen aus Versuch 3. Die Chromosomen wurden mit DAPI (blau) angefärbt. **(a-c)** Kontrolle: 1xPBS und **(d-f)** ohne Injektion. Skalierungsleiste entspricht einer Größe von 10 μm .

Die Ähren der unbehandelten Kontrollen waren in allen Versuchen nach drei Tagen Inkubationszeit größer als die der behandelten Pflanzen, obwohl die Pflanzen alle ungefähr das gleiche externe Stadium aufwiesen. Dies lässt vermuten, dass die Injektion einen Einfluss auf das Wachstum der Pflanze hat. Die behandelten Pflanzen, welche nicht fixiert wurden, um zu prüfen, ob mit Zebularin behandelte Pflanzen Pollenkerne sowie Samen entwickeln, sind schon ab einer Konzentration von 10 μM Zebularin nicht weiter gewachsen und abgestorben. Dies war jedoch auch bei den meisten EdU-Kontrollen der Fall, so dass dieser Effekt nicht alleine auf die Chemikalie zurückzuführen ist.

3.3 Validierung der quantitativen Echtzeit-PCR

Die erstellten Primerpaare mit Sonden wurden zu Beginn erst einzeln getestet, um herauszufinden, ob die Primerpaare und Sonden spezifisch binden und somit keine Hintergrundsignale entstehen. Nachdem dieser Test erfolgreich war, wurden die Primerpaare und Sonden zusammen in einer PCR-Reaktion getestet, um auszuschließen, dass sie sich gegenseitig beeinflussen. Getestet wurden zwei Primerpaare mit je zwei allel-spezifischen Sonden für Morex und Barke. Die ersten Tests wurden mit einem DNA-Gehalt von 2 ng/μl durchgeführt, woraus sich bei einem Gesamtvolumen von 10 μl eine Gesamtmenge von 20 ng ergibt. Ziel war es, dass diese Primerpaare und Sonden mit nur einem haploiden Pollenkern funktionieren. Ein haploider Pollenkern der Gerste hat einen DNA-Gehalt von 5,175 pg (Bennett 1972). Deswegen wurden verschiedene Konzentrationen an DNA in den PCR-Reaktionen getestet. Die PCR funktioniert bis zu einer Konzentration von 20 pg/μl zu 100 %. Bei der Auswertung des Versuches ist bei dieser Konzentration ein klares Muster, ohne Ausreißer, zu erkennen, wobei sich das Cluster für Morex an der X-Achse anordnet, und dass von Barke an der Y-Achse (Tabelle 14, Abbildung 16).

Tabelle 14: Erfolgsraten der Fluoreszenz-PCR bei verschiedenen DNA-Konzentrationen

DNA Konzentration [pg/μl]	2000	200	20	2	0,2
Assay 1	100 %	100 %	100 %	50 %	0 %
Assay 28	100 %	100 %	100 %	17 %	0 %

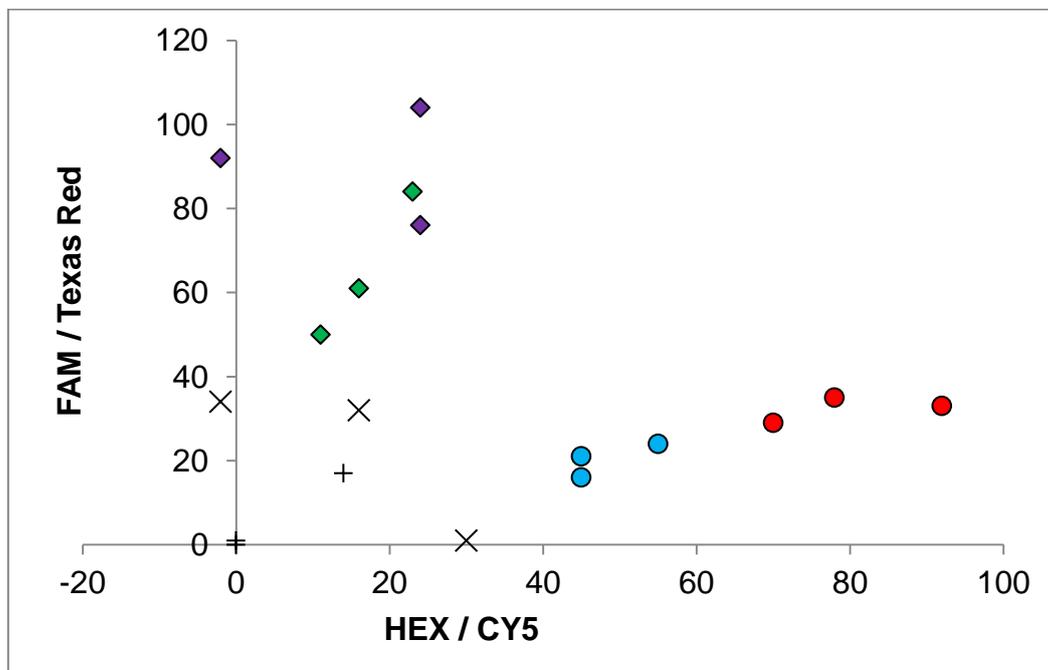


Abbildung 16: Darstellung der Fluoreszenzsignale der Marker von Assay 1 und Assay 28 bei einer DNA-Konzentration von 20 pg/μl für die PCR-Reaktion. (●) Assay 1 Signal für Morex, (◆) Assay 1 Signal für Barke, (●) Assay 28 Signal für Morex, (◆) Assay 28 Signal für Barke, (×) Negativkontrolle Assay 1 und (+) Negativkontrolle Assay 28.

Bei einer Konzentration von 2 pg/μl liegt die Erfolgsrate bei dem einen Primerpaar von Assay 1 noch bei 50 % und bei dem anderen Primerpaar bei 17 %. In der Auswertung des Versuches ist im Diagramm das gewünschte Muster zu erkennen, jedoch sind mehrere Werte in der Nähe der Negativkontrollen angeordnet, woraus sich schließen lässt, dass die Fluoreszenz-PCR in diesen Reaktionen nicht funktioniert hat (Abbildung 17). Bei einer DNA-Konzentration von etwa 2 pg/μl funktioniert die PCR somit noch, jedoch ist die Effizienz geringer als bei höheren Konzentrationen. Ist die DNA-Konzentration geringer funktioniert die Fluoreszenz-PCR nicht mehr (Tabelle 14).

Damit mit einem Pollenkern eine DNA-Konzentration größer als 2 pg/μl in der PCR-Reaktion entsteht, wurde das Gesamtvolumen auf 2 μl reduziert, wodurch sich mit einem Pollenkern eine DNA-Konzentration von etwa 2,5 pg/μl ergibt. Dies wurde zunächst mit genomischer DNA getestet. Es zeigten sich keine Probleme bei der Volumenreduzierung.

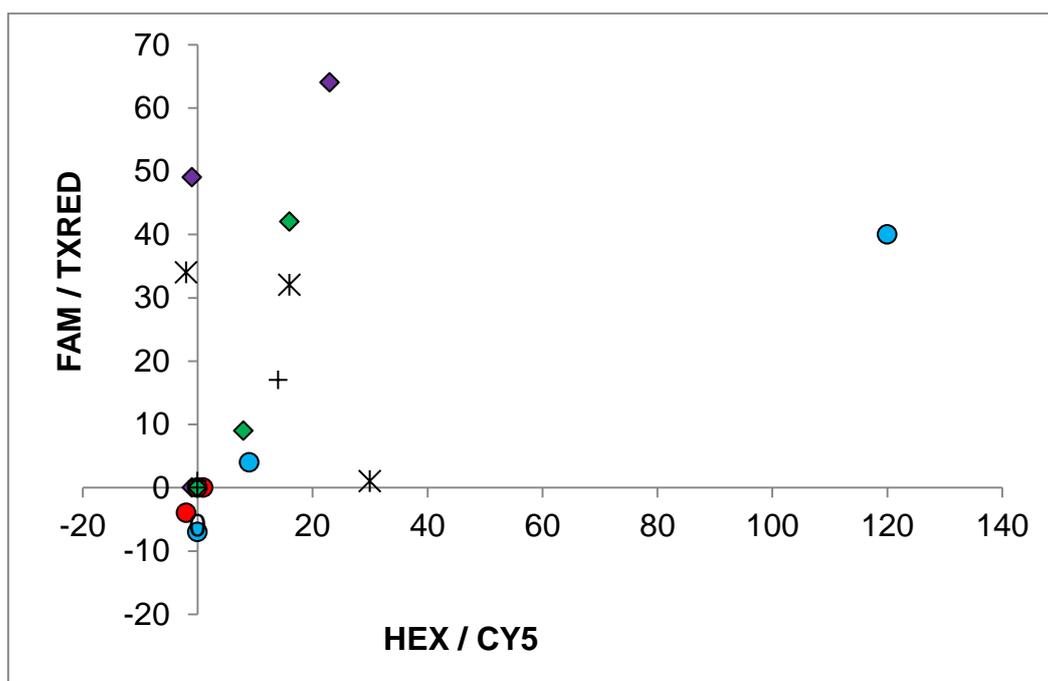


Abbildung 17: Darstellung der Fluoreszenzsignale der Marker von Assay 1 und Assay 28 bei einer DNA-Konzentration von 2 pg/μl für die PCR-Reaktion. (●) Assay 1 Signal für Morex, (◆) Assay 1 Signal für Barke, (●) Assay 28 Signal für Morex, (◆) Assay 28 Signal für Barke, (*) Negativkontrolle Assay 1 und (+) Negativkontrolle Assay 28.

Nachdem die vorherigen Tests erfolgreich waren, wurde die Fluoreszenz-PCR mit durchflusszytometrisch isolierten Blatt- und Pollenkernen getestet. Als Positivkontrollen wurden 100 und 10 Blattkerne pro Reaktion sortiert, um einen höheren DNA-Gehalt zu haben. Die Blattkerne vom Morex und Barke dienten auch dazu, um das Signal der Pollkerne einer der beiden Varianten oder der Negativkontrolle zuzuordnen zu können. Zudem wurden auch einzelne Blattkerne getestet, um zu überprüfen, ob sich der DNA-Gehalt stark auswirkt. In Blattkernen ist der doppelte DNA-

Gehalt wie in Pollenkernen zu finden, da diese diploid anstatt haploid sind. In diesem Versuch wurde nur die Erfolgsrate von Assay 1 alleine getestet. Aus den Ergebnissen zeigt sich, dass die Fluoreszenz-PCR bei 100 und 10 Blattkernen immer funktioniert hat. Bei den einzelnen Blattkernen zeigte sich schon eine deutlich geringere Erfolgsrate von etwa 19 %. Bei den Pollenkernen ist die Effizienz nochmal um mehr als die Hälfte geringer als bei den Blattkernen (Tabelle 15).

Tabelle 15: Erfolgsraten der Fluoreszenz-PCR mit Blatt- und Pollenkernen (Assay 1) bei einem Gesamtvolumen von 2 µl.

Probe	Erfolgsrate [%]
100 Blattkerne	100
10 Blattkerne	100
1 Blattkern	19
1 Pollenkern (F1)	6

Eine Erhöhung der Anzahl der Zyklen von 55 auf 75 zeigte keine Verbesserung der Erfolgsrate. Aufgrund der Vermutung, dass die Struktur der einzelnen Pollenkerne eine Rolle spielt, und da im Diagramm des Durchflusszytometers zwei Fraktionen erkennbar sind, die sich in dem Streulichtwert unterscheiden, wurden diese beiden Fraktionen getrennt sortiert. Vermutlich unterscheiden sich diese Pollenkerne in der Kompaktheit der DNA, sodass möglicherweise in einer Fraktion die DNA-Bereiche zugänglicher für die PCR-Reaktion sind. Ein erster Versuch zeigt, dass in der unteren Fraktion mit geringerem Streulichtwert, welche die generativen Pollenkerne beinhaltet, die Effizienz der Fluoreszenz-PCR für Assay 1 höher ist, als in der oberen Fraktion mit höherem Streulichtwert, welche die vegetativen Pollenkerne beinhaltet. Die vegetativen Pollenkerne weisen etwa die gleiche Erfolgsrate auf, wie die einzelnen Blattkerne (Tabelle 16). Ein Unterschied in der Effizienz der Fluoreszenz-PCR zwischen vegetativen und generativen Pollenkernen konnte in Versuchen, in denen beide Marker getestet wurden nicht bestätigt werden, so dass in den folgenden Versuchen nicht zwischen diesen Fraktionen unterschieden wurde.

Tabelle 16: Erfolgsraten der Fluoreszenz-PCR mit Blatt- und Pollenkernen (Assay 1) mit Unterscheidung des Streulichtwertes beim Sortieren mit dem Durchflusszytometer (vegetative und generative Pollenkerne) bei einem Gesamtvolumen von 2 µl.

Probe	Erfolgsrate [%]
F1 1 Pollenkern (vegetativ)	17
F1 1 Pollenkern (generativ)	29
Einzelner Blattkern	17

Bei der Auswertung des Versuchs ergibt sich bei beiden Fraktionen ein eindeutiges Cluster für die Zuordnung des SNPs in den Pollen der F1-Hybriden zu einer der beiden Varietäten Morex oder Barke. Die Signale der Pollenkerne bilden zusammen mit den Positivkontrollen, mit jeweils 10 Blattkernen

pro Reaktion, ein Cluster, ebenso wie Fluoreszenzsignale der Negativkontrollen mit den Signalen der Pollenkerne, in denen die Fluoreszenz-PCR-Reaktion nicht funktioniert hat (Abbildung 18, Abbildung 19).

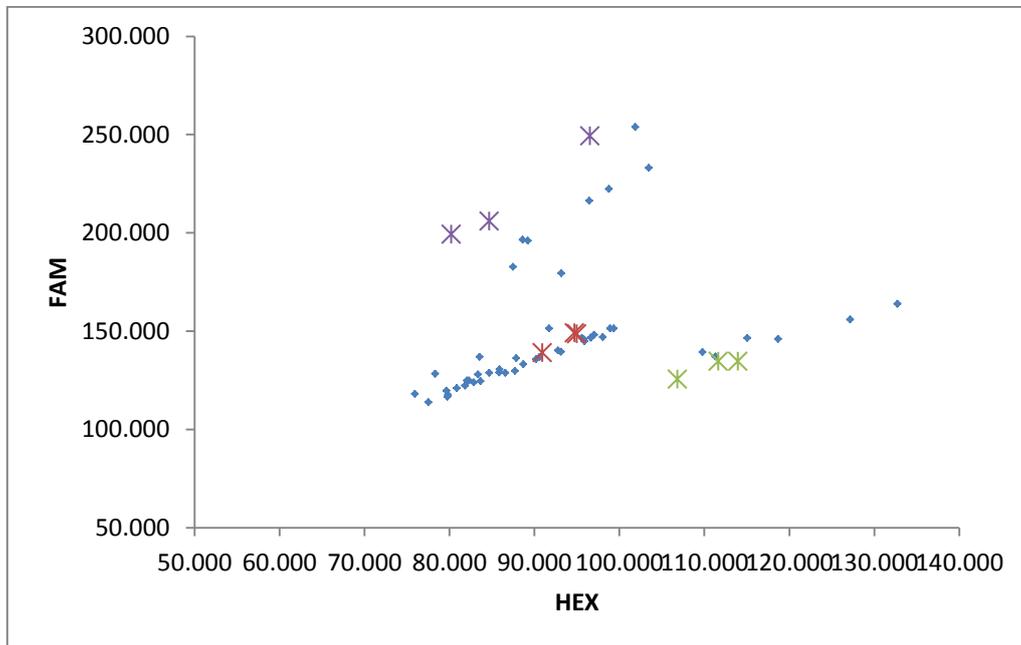


Abbildung 18: Darstellung der Fluoreszenzsignale der Marker von Assay 1 bei Blatt- und Pollenkernen als verwendetes Template. Pollenkerne wurden anhand eines geringen Streulichtwertes sortiert. (grün) Positivkontrolle Morex, (lila) Positivkontrolle Barke, (rot) Negativkontrolle und (blau) F1 Pollen.

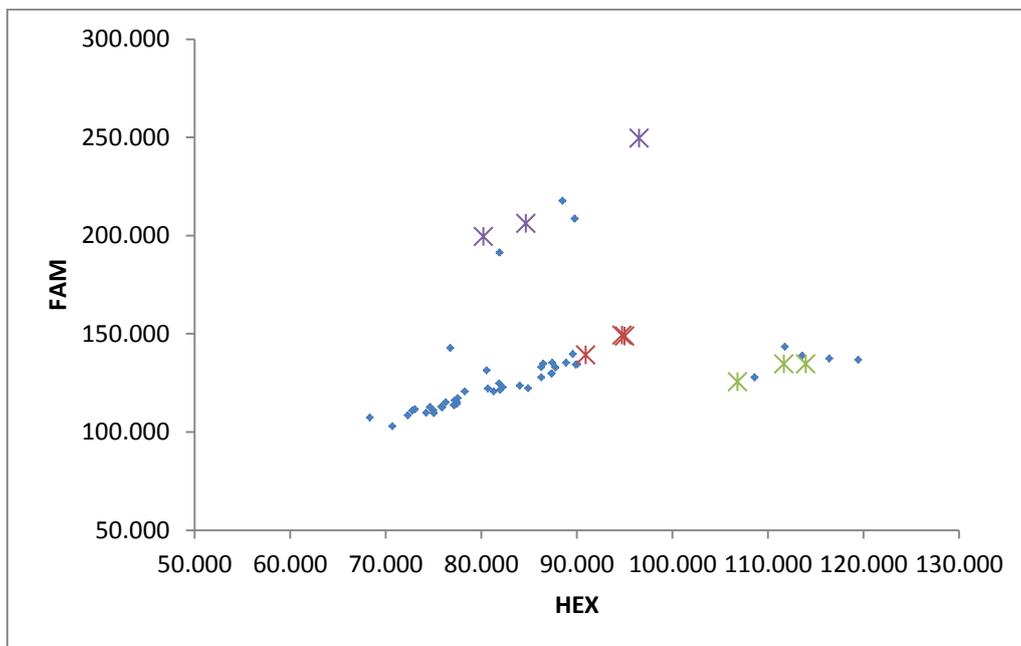


Abbildung 19: Darstellung der Fluoreszenzsignale der Marker von Assay 1 bei Blatt- und Pollenkernen als verwendetes Template. Pollenkernen wurden anhand eines hohen Streulichtwertes sortiert. (grün) Positivkontrolle Morex, (lila) Positivkontrolle Barke, (rot) Negativkontrolle und (blau) F1 Pollen.

In einem weiteren Test der Fluoreszenz-PCR mit durchflusszytometrisch sortierten Blatt- und Pollenkernen, wobei in diesem Versuch beide Marker gleichzeitig getestet wurden, zeigte sich, dass die Effizienz bei Blattkernen höher ist als bei den haploiden Pollenkernen. Es zeigt sich, dass die Rate für eine erfolgreiche Fluoreszenz-PCR beider Marker auf dem gleichen haploiden Pollenkern deutlich geringer ist, als für die Marker einzeln betrachtet. Bei den einzelnen Blattkernen liegt die Erfolgsrate von Assay 1 bei 30 % und bei Assay 28 bei 18 %, jedoch haben nur in 8 % der Reaktionen beide Assays funktioniert. Bei den Reaktionen mit haploiden Pollenkernen haben auf keinem Pollenkern beide Marker gleichzeitig funktioniert, wodurch es nicht möglich ist die Rekombination in dem Intervall zu bestimmen (Tabelle 17).

Tabelle 17: Erfolgsraten der Fluoreszenz-PCR mit Blatt- und Pollenkernen (Assay 1 und Assay 28) bei einem Gesamtreaktionsvolumen von 2 μ l.

Probe	Assaynummer	Erfolgsrate [%]
1 Blattkern	1	30
1 Blattkern	28	18
1 Blattkern	1 und 28	8
1 Pollenkern (F1)	1	10
1 Pollenkern (F1)	28	6
1 Pollenkern (F1)	1 und 28	0

Die vorherigen Versuche zeigen eine deutlich zu geringe Erfolgsrate für beide Marker bei der Fluoreszenz-PCR. Zur Messung der Rekombination in dem Intervall ist es jedoch notwendig, dass beide Marker auf dem gleichen Pollenkern simultan funktionieren. Aufgrund der Vermutung, dass Proteine, welche an das Chromatin der haploiden Pollenkerne bzw. der diploiden Blattkerne gebunden sind, die Bindung der Primer behindern könnten, wurde Proteinase K angewandt. Diese soll möglichst alle potentiell störenden Proteine von dem Chromatin entfernen. Dies wurde zunächst mit einem Gesamtreaktionsvolumen von 10 μ l getestet, da die Kerne dadurch nicht in ein zu kleines Volumen sortiert werden mussten und somit auch das Volumen an Proteinase K-Lösung höher war. Diese Methode wurde in drei zeitlich voneinander unabhängigen Versuchen mit Pollenkernen von drei unterschiedlichen Ähren getestet. Für die Blattkerne ergibt sich eine durchschnittliche Erfolgsrate von 78 % für beide Marker gleichzeitig, wobei die Schwankung zwischen den Versuchen mit einer Standardabweichung von 20 % sehr hoch ist. In durchschnittlich 9 % der Reaktionen funktionieren mit dieser Methode beide Marker auf dem gleichen haploiden Pollenkern, wobei die Abweichung zwischen den Versuchen etwa 4 % beträgt. Auch in diesem Versuch zeigt sich, dass die Erfolgsraten für die Marker einzeln betrachtet deutlich höher sind. Bei den Pollenkernen ist die Rate etwa 20 % höher (Tabelle 18).

Tabelle 18: Erfolgsraten der Fluoreszenz-PCR mit Blatt- und Pollenkernen (Assay 1 und Assay 28) bei einem Gesamtreaktionsvolumen von 10 µl mit vorheriger Proteinase K-Behandlung der sortierten Kerne. Durchschnittliche Werte aus drei zeitlich voneinander unabhängigen Versuchen.

Probe	Assaynummer	Erfolgsrate [%] (Standardabweichung [%])
1 Blattkern	1	87 (+- 8)
1 Blattkern	28	83 (+-20)
1 Blattkern	1 und 28	78 (+-19)
1 Pollenkern (F1)	1	26 (+- 16)
1 Pollenkern (F1)	28	29 (+-6)
1 Pollenkern (F1)	1 und 28	9 (+- 4)

Nachdem die Effizienz durch die Vorbehandlung der Pollenkerne durch Proteinase K gesteigert werden konnte, wurde das Gesamtreaktionsvolumen auf 2 µl reduziert. Es zeigt sich, dass ein geringeres Reaktionsvolumen einen negativen Einfluss auf die Erfolgsrate hat. Bei den Pollenkernen ist sie von durchschnittlich 9 % auf 2 % gesunken. Die Erfolgsrate für beide Marker auf einem Kern sank bei der Volumenreduzierung um etwa 44 % (Tabelle 19). Aufgrund dieses Ergebnisses wurden die weiteren Versuche, trotz der erhöhten Kosten pro Reaktion, mit einem Reaktionsvolumen von 10 µl durchgeführt.

Tabelle 19: Erfolgsraten der Fluoreszenz-PCR mit Blatt- und Pollenkernen (Assay 1 und Assay 28) bei einem Gesamtreaktionsvolumen von 2 µl mit vorheriger Proteinase K-Behandlung der sortierten Kerne. Durchschnittliche Werte aus 2 zeitlich voneinander unabhängigen Versuchen bei den Blattkernen.

Probe	Assaynummer	Erfolgsrate [%]
1 Blattkern	1	56 (+- 9)
1 Blattkern	28	42 (+- 8)
1 Blattkern	1 und 28	34 (+- 8)
1 Pollenkern (F1)	1	19
1 Pollenkern (F1)	28	15
1 Pollenkern (F1)	1 und 28	2

Eine weitere Idee, die Erfolgsrate zu steigern, war eine vorhergehende Behandlung der Zellkerne mit Wärme durch eine Mikrowelle mit anschließender Proteinase K-Behandlung. Der Grundgedanke war, dass sich das Chromatin durch die vorherige Wärmebehandlung öffnet und die Proteinase K so einfacher chromatin-gebundene Proteine abbauen kann. Bei den Blattkernen führt diese Behandlung zu einer Erfolgsrate von 45 % für beide Marker gleichzeitig. Die Erfolgsrate bei den Pollenkernen liegt bei 15 %, wobei die Erfolgsrate für die Marker einzeln betrachtet jeweils bei 40 % liegt. Dies ist höher als bei der Vorbehandlung nur mit Proteinase K. Die Erfolgsraten für die Fluoreszenz-PCR bei den Blattkernen ist in diesem Versuch jedoch niedriger als bei den Versuchen nur mit Proteinase K (Tabelle 20).

Tabelle 20: Erfolgsraten der Fluoreszenz-PCR mit Blatt- und Pollenkernen (Assay 1 und Assay 28) bei einem Gesamtreaktionsvolumen von 10 µl mit vorheriger Wärmebehandlung mit der Mikrowelle und Proteinase K-Behandlung der sortierten Kerne.

Probe	Assaynummer	Erfolgsrate [%]
1 Blattkern	1	78
1 Blattkern	28	65
1 Blattkern	1 und 28	45
1 Pollenkern (F1)	1	40
1 Pollenkern (F1)	28	40
1 Pollenkern (F1)	1 und 28	15

Aufgrund der Vermutung, dass der geringe DNA-Gehalt der Grund für die geringe Effizienz der Fluoreszenz-PCR ist, wurde getestet, ob eine vorangehende PEP-PCR die Erfolgsrate steigert. Durch die PEP-PCR werden durch 15-Basen-Oligonukleotide, bei denen sich jede der 4 Basen an einer beliebigen Stelle befindet, lange DNA-Fragmente amplifiziert. Dies führt zu einer erhöhten Anzahl an Kopien von bestimmten DNA-Bereichen, wodurch auch die Abschnitte in denen die Templates für die Fluoreszenz-PCR vorkommen vermehrt vorliegen sollten. In einem ersten Versuch funktionieren bei der Fluoreszenz-PCR in 35 % der Reaktionen beide Marker auf dem gleichen Pollenkern. Bei den Blattkernen lag die Erfolgsrate dafür bei 75 % (Tabelle 21).

Tabelle 21: Erfolgsraten der Fluoreszenz-PCR mit Blatt- und Pollenkernen (Assay 1 und Assay 28) bei einem Gesamtreaktionsvolumen von 10 µl mit vorheriger PEP-PCR mit 1 U Taq-Polymerase.

Probe	Assaynummer	Erfolgsrate [%]
1 Blattkern	1	87
1 Blattkern	28	85
1 Blattkern	1 und 28	75
1 Pollenkern (F1)	1	67
1 Pollenkern (F1)	28	54
1 Pollenkern (F1)	1 und 28	35

Aus Kostengründen wurde die Konzentration der Taq-Polymerase für die PEP-PCR von 1 U auf 0,2 U reduziert. Es zeigt sich, dass die Erfolgsrate bei Reduzierung der Taq-Polymerase deutlich abnimmt. Bei den Pollenkernen sinkt sie um 14 % und bei den Blattkernen um 35 % (Tabelle 22).

Tabelle 22: Erfolgsraten der Fluoreszenz-PCR mit Blatt- und Pollenkernen (Assay 1 und Assay 28) bei einem Gesamtreaktionsvolumen von 10 µl mit vorheriger PEP-PCR mit 0,2 U Taq-Polymerase.

Probe	Assaynummer	Erfolgsrate [%]
1 Blattkern	1	80
1 Blattkern	28	58
1 Blattkern	1 und 28	40
1 Pollenkern (F1)	1	52
1 Pollenkern (F1)	28	38
1 Pollenkern (F1)	1 und 28	21

Der Vergleich der Rate der Reaktionen in denen beide Marker auf einem haploiden Pollenkern funktioniert haben zeigt sich, dass die Kombination aus der Vorbehandlung mit Proteinase K und der PEP-PCR mit 1 U Taq-Polymerase zu dem deutlich besten Ergebnis führt. In 35 % der Reaktionen kann mit dieser Methode die Rekombination in dem Intervall gemessen werden. Bei Verwendung von weniger Polymerase für die PEP-PCR ist dies nur noch in 21 % der Reaktionen der Fall. Ohne Vorbehandlung mit einem Reaktionsvolumen von 2 µl kann mittels der Fluoreszenz-PCR in keiner durchgeführten Reaktion die Rekombination in dem Intervall zwischen den Markern gemessen werden. Durch die Vorbehandlung der Pollenkerne mit Proteinase K kann eine Steigerung der Erfolgsrate erreicht werden. Es zeigt sich dabei, dass ein Reaktionsvolumen von 10 µl besser ist als eins von 2 µl (Abbildung 20).

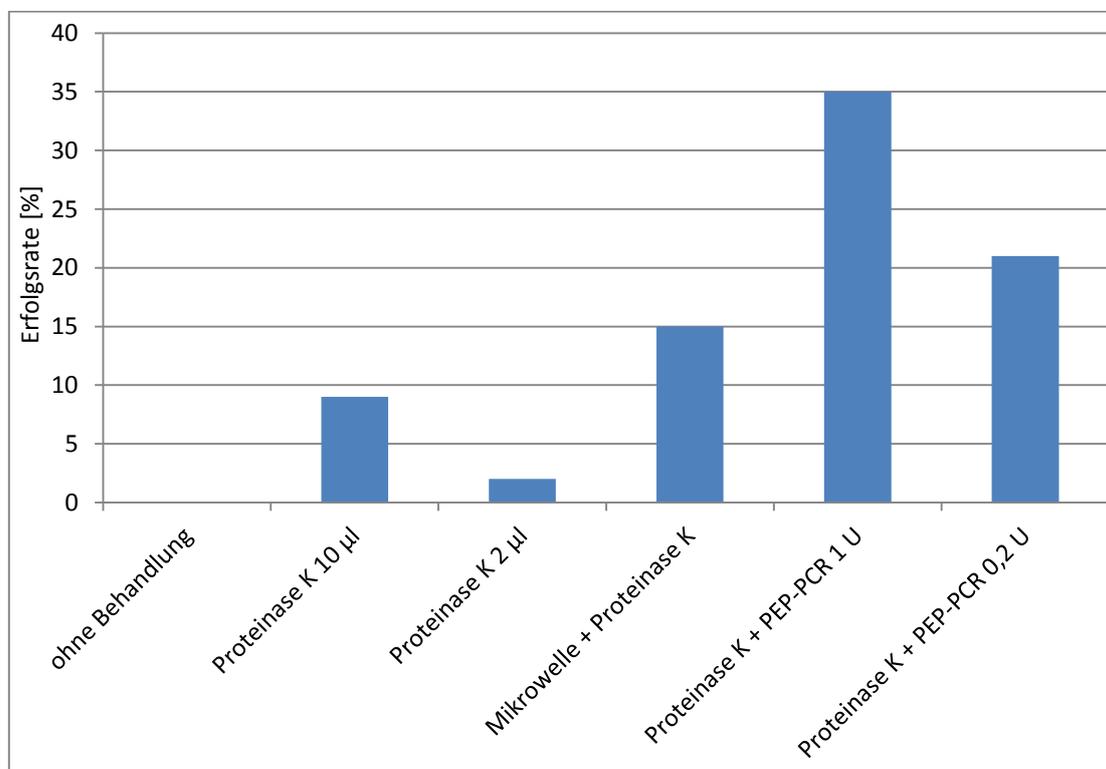


Abbildung 20: Darstellung der Rate der Reaktionen in denen beide Marker auf einem haploiden Pollenkern simultan funktioniert haben bei unterschiedlichen Vorbehandlungen.

4 Diskussion

Eine Methode zum *in planta* Injizieren gelöster Chemikalien in Ähren der Gerste vor und während der Meiose, sowie eine PCR-basierte Methode zum Messen der meiotischen Rekombinationshäufigkeit innerhalb eines Intervalls auf dem Gerstenchromosom 3H anhand einzelner Pollenkerne wurden etabliert. Zudem suggerieren die Ergebnisse der Behandlung der Gerste mit Zebularin einen Effekt der Chemikalie auf die Meiose.

4.1 Entwicklung einer Methode zum *in planta* Injizieren gelöster Chemikalien in Ähren der Gerste

Die Methode zum Injizieren der Chemikalien wurde für das Thymidin-Analogon EdU etabliert. Es zeigte sich, dass die Ähre bei der Injektion etwa 1 cm groß sein sollte, so dass EdU während der meiotischen DNA-Replikation in die DNA eingebaut werden kann. Zu diesem Zeitpunkt befinden sich die Gerstenpflanzen in den externen Stadien 31 oder 32 (Gómez und Wilson 2012, Abbildung 21, Tabelle 23). Ziel war es, nach der Behandlung mit EdU markierte meiotische Zellen zu finden. Die Wahrscheinlichkeit, meiotische Stadien wie Diakinese und Metaphase I, zu finden, ist bei Ähren mit einer Größe von etwa 1,7 cm bis 2,9 cm am höchsten. Es fanden sich jedoch auch in Ähren mit einer Größe von etwa 4 cm diese Stadien im oberen Teil der Ähren. Die Ähre befindet sich zumeist bei einer Größe zwischen 2 cm und 3 cm in der Meiose (Gómez und Wilson 2012), was sich durch die Ergebnisse der Arbeit weitestgehend bestätigen lässt. Die Verteilung der Ährengröße im Zusammenhang mit dem externen Wachstumsstadium zeigte sich bei Gómez und Wilson (2012) sehr variabel. In den Stadien 33 und 33,5 ist es am wahrscheinlichsten Ähren mit meiotischen Stadien zu erhalten. Im Stadium 33 schwankt die Größe der Ähre um etwa 0,54 cm um den Mittelwert 2,46 cm (Tabelle 23). In dem gleichen externen Stadium waren die Ähren auch zu einem geringen Anteil zwischen 4,1 cm und 5 cm groß. Auch in dem späteren externen Stadium 34, bei dem der Mittelwert bei 3,9 cm liegt, besteht trotzdem die Möglichkeit Ähren mit einer Größe zwischen 1,1 cm und 2 cm zu erhalten (Gómez und Wilson 2012, Tabelle 23). Auch in den Gerstenpflanzen, die in dieser Arbeit verwendet wurden zeigte sich diese Variabilität.

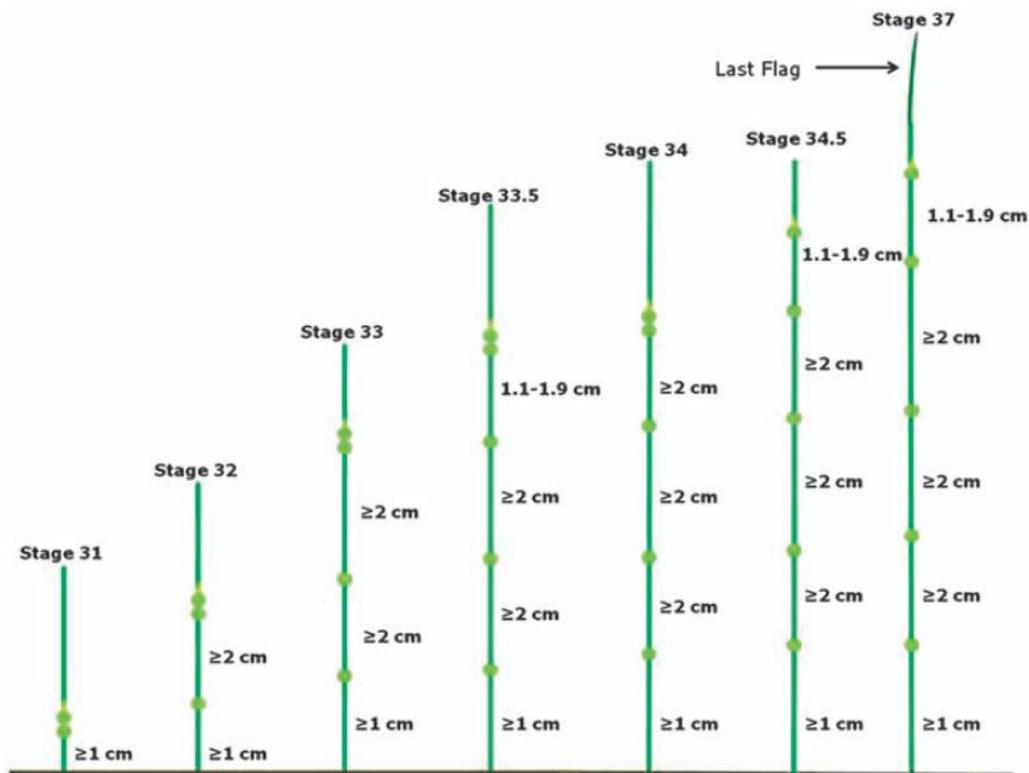


Abbildung 21: Externe Wachstumsstadien nach der Zadoks-Skala (ZADOKS et al. 1974) mit Ergänzung der Zwischenstadien 33,5 und 34,5 durch Gómez und Wilson (2012).

Tabelle 23: Größe der Ähren in Zusammenhang mit den externen Wachstumsstadien (Gómez und Wilson 2012).

Stage	Spike size (cm)	Number of samples
31	0.52 ± 0.18	15
32	1.17 ± 0.54	30
33	2.46 ± 0.97	58
33.5	3.14 ± 0.72	28
34	3.90 ± 1.15	52
34.5 (35)	4.77 ± 0.89	15
37	6.11 ± 1.12	20
LFE1	7.14 ± 1.29	25
LFE2	9.38 ± 1.27	15
LFE3	9.19 ± 0.77	17

Die verwendete Methode zum Injizieren der Chemikalie mit einer Injektionsspritze wurde schon in anderen Versuchen erfolgreich angewandt. Dabei wurde die Chemikalienlösung in den Raum, in der sich die entwickelnde Ähre befindet gefüllt, indem die Spritze durch den Blättermantel um die Ähre gestochen wurde (Vega und Feldman 1998). Mit der gleichen Injektionsmethode wurde auch schon EdU in Gerstenpflanzen injiziert. Dabei wurden verschiedene Konzentrationen von 10 mM (Higgins et al. 2012) und 10 µM (Colas et al. 2016) EdU verwendet. In dieser Arbeit zeigte sich, dass bei einer

Konzentration von 10 mM EdU die besten Ergebnisse erzielt werden konnten, jedoch auch die Anwendung von 1 mM EdU zu guten Ergebnissen führte. Zudem ist die Erfolgsrate bei der Markierung der meiotischen Zellen abhängig von dem Stadium der Ähre während der Injektion.

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen, konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob genau zum Zeitpunkt der DNA-Replikation injiziert wurde, im Gegensatz zu den Versuchen von Higgins et al. (2014) und Colas et al. (2016), wo der Zeitpunkt der Injektion bestimmbar war durch eine zweite DNA-markierende Substanz bzw. einem Impuls, bei dem die EdU-Lösung zwei Stunden nach der Injektion wieder entfernt wurde. Die Stadien Leptotän und Zygotän waren frühestens 45 Stunden und Pachytän 47 Stunden nach der Injektion markiert. Eine Markierung bis zur Telophase II war frühestens nach 69 Stunden zu finden. Dies war bei beiden angewandten Injektionsmethoden der Fall. Die beiden verwendeten Genotypen Barke und Morex zeigten keine erkennbaren Unterschiede im zeitlichen Verlauf der Meiose. Bei Higgins et al. (2012) ergab sich eine Gesamtdauer von 43 Stunden für die Meiose in Gerste. Bei Colas et al. (2016) waren schon 6 Stunden nach der Injektion meiotische Zellen bis zum Stadium Zygotän markiert. Nach 24 Stunden waren Zellen im Diplotän markiert und nach 48 Stunden auch zum geringen Anteil Metaphasen I. Nach 72 Stunden waren Stadien bis zur Anaphase I mit EdU markiert (Colas et al. 2016). Die zeitlichen Unterschiede in der Dauer der Meiose zu Higgins et al. (2012) könnten auf den unterschiedlichen Wachstumsbedingungen beruhen. In Higgins et al. (2012) wuchsen die Pflanzen im gleichen Tag/Nacht-Rhythmus wie in dieser Arbeit, jedoch lag die Temperatur bei 22 °C im Gegensatz zu 18 °C. Bei einer Erhöhung der Temperatur von 22 °C auf 30 °C zeigte sich schon eine Verkürzung der Dauer der prämeiotischen S-Phase von 13 Stunden auf 9 Stunden (Higgins et al. 2012), was möglicherweise auch auf die Dauer der Meiose übertragbar ist. In der Arbeit von Colas et al. (2016) wurde ein anderer Genotyp verwendet, wodurch die Unterschiede in der Meiose und der EdU-Markierung beruhen könnten.

Eine nur teilweise Markierung der meiotischen Zellkerne mit EdU zeigte sich vor allem in Stadien später als Pachytän. Es waren in solchen Fällen nur die heterochromatischen perizentromerischen und zentromerischen Bereiche markiert. Die früh replizierenden distalen Regionen, in denen die meisten Crossover stattfinden, waren nicht mit EdU markiert. Dieses Phänomen zeigte sich auch bei Higgins et al. (2012) und Colas et al. (2016). Eine Vermutung ist, dass während der meiotischen S-Phase injiziert wurde, sodass die distalen Regionen zu diesem Zeitpunkt schon repliziert waren, da Hetero- und Euchromatin zeitliche Unterschiede bei der DNA-Replikation aufweisen, wobei Euchromatin früher repliziert wird.

4.2 Entwicklung der Pollengenotypisierung

Die Pollengenotypisierung ermöglicht eine effiziente Analyse der meiotischen Rekombination in individuellen haploiden Pollenkernen. Dadurch wird zum Beispiel eine Generierung einer Segregationspopulation umgangen. Durch eine Gesamtgenomamplifikation ist es möglich sehr viele KASP-Marker zu verwenden, wodurch eine genomweite Analyse potentiell möglich wird (Dreissig et al. 2015). In dieser Arbeit wurde die Gesamtgenomamplifikation vermieden, da nur die Häufigkeit der Rekombination in einem bestimmten Intervall bestimmt werden soll. Die Erfolgsrate für das Genotypisieren von haploiden Pollenkernen lag bei etwa 70 % bei vorheriger Gesamtgenomamplifikation (Dreissig et al. 2015). Die Gesamtgenomamplifikation ist mit 4,40 € pro Reaktion vergleichsweise sehr teuer und sollte vermieden werden. Eine Fluoreszenz-PCR-Reaktion mit den Fluoreszenzmarkern, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurde, kostet etwa 70 Cent pro Reaktion bei einem Reaktionsvolumen von 10 µl. Es müssen nur zwei Marker auf dem gleichen Chromosom gleichzeitig funktionieren, um ein Intervall messen zu können, wodurch die Gesamtgenomamplifikation nicht unbedingt notwendig ist. Die Erfolgsrate der Fluoreszenz-PCR-Reaktion für beide Marker simultan auf einem Pollenkern lag jedoch ohne Vorbehandlung der Pollenkerne bei 0 %. Die Effizienz konnte durch eine Vorbehandlung mit Proteinase K auf 9 % gesteigert werden, wobei die Behandlung mit Proteinase K nur 0,1 Cent pro Reaktion mehr kostet. Der Preis pro erfolgreicher Reaktion beträgt etwa 7,80 €. Verglichen mit der Genotypisierung mittels KASP-Markern nach der Gesamtgenomamplifikation, welche etwa 6,30 € pro erfolgreicher Reaktion nur für die Gesamtgenomamplifikation kostet (Dreissig et al. 2015), ist diese Methode mit dieser geringen Effizienz teurer. Durch eine PEP-PCR vor der Fluoreszenz-PCR konnte bei der Verwendung von 1 U Taq-Polymerase pro PEP-PCR-Reaktion eine Effizienz von etwa 35 % erreicht werden. Mit dieser Methode kostet eine erfolgreiche Reaktion ungefähr 3,20 €. Eine erfolgreiche Reaktion kostet etwa 3,70 €, wenn bei der PEP-PCR nur 0,2 U Taq-Polymerase eingesetzt werden. Zusätzlich zu dem höheren Preis müssen bei der geringeren Effizienz auch mehr Platten verwendet werden für die gleiche Anzahl an erfolgreichen Reaktionen.

4.3 Einfluss von DNA-Methylierungsinhibitoren

Die erste getestete Chemikalie zur Beeinflussung der meiotischen Rekombination in der Gerste war Zebularin. Dies ist ein Analogon von Cytidin und wird während der Replikation in die DNA eingebaut und inhibiert somit die Methylierung der DNA. In den Versuchen zeigte sich, dass Zebularin einen Einfluss auf die Meiose hat. Schon bei einer Konzentration von 10 µM Zebularin waren in etwa 30 % der Metaphasen I und Diakinesen Defekte, wie langgezogenes Chromatin und Fragmente, zu sehen. Das langgezogene Chromatin könnte auf einer gestörten Chromatinkondensation beruhen, welche sich auch in *Arabidopsis* bei einer Behandlung mit Zebularin zeigt (Baubec et al. 2009). Bei einer Konzentration von 100 µM war die Rate an Anomalien geringfügig höher. Ein sehr ähnlicher Effekt

von Zebularin wurde in der Mitose in *Triticale* festgestellt (Ma et al. 2016). Es war kein Effekt von Zebularin zu sehen in den Ähren, die mit 1 mM Zebularin behandelt wurden. Bei diesen Pflanzen wurde vermutlich nach der meiotischen DNA-Replikation injiziert, sodass das Zebularin nicht in die DNA eingebaut wurde. In Säugerzellen wurde gezeigt, dass Zebularin nur 1 von 8000 Deoxycytidin ersetzt (Ben-Kasus et al. 2005). Für 5-Azacytidin liegt die Rate bei bis zu 5 % (Jones und Taylor 1980), wodurch der Effekt dieser Chemikalie vermutlich größer ist als der von Zebularin. Ein Zählen der Crossover wurde nicht durchgeführt, da für die Mikroskopie keine Marker für Crossover verwendet wurden, wodurch nur ein weniger genaues zählen anhand der Bivalentmorphologie möglich wäre. Ein Einfluss der DNA-Methylierung auf die meiotische Rekombination wurde in *Ascobolus immerses* festgestellt. Die prämeiotisch induzierte Methylierung eines Rekombinations-Hotspots auf beiden Chromosomen führte zu einer Reduzierung der meiotischen Rekombination zwischen zwei Markern, die den Hotspot flankieren, um mehr als das Hundertfache. Das zeigt, dass DNA-Methylierung die homologe Rekombination stark inhibiert. Wenn der Hotspot auf nur einem der homologen Chromosomen methyliert wurde, dann waren Crossover noch um etwa das 50-fache reduziert. Die DNA-Methylierung könnte möglicherweise die Paarung der Homologen stören oder die normale Entwicklung von Zwischenprodukten in der meiotischen Rekombination beeinträchtigen (Maloisel und Rossignol 1998). Eine Wirkung von Zebularin in Pflanzen wurde durch die Zugabe von Zebularin zum Wachstumsmedium in zwei Spezies gezeigt (Baubec et al. 2009). Es wurde durch diese Behandlung die Cytosinmethylierung signifikant reduziert. Zebularin zeigte im Vergleich zu 5-Azacytidin eine gering höhere globale Demethylierung. In *Arabidopsis* bewirkte Zebularin eine konzentrationsabhängige Reduktion der Cytosinmethylierung, wobei alle Methylierungstypen gleichermaßen reduziert wurden. Die Hypomethylierung durch Zebularin war, soweit erkennbar durch molekulare und zytologische Analysen, in den zentromerischen repetitiven Sequenzen deutlich weniger ausgeprägt als im Rest des Genoms. Inhibitor behandelte Pflanzen zeigen Veränderungen in der Kernorganisation. Dies lässt darauf schließen, dass kleine Veränderungen in der DNA-Methylierung ausreichen, um die Erhaltung des Kondensationsstadiums zu stören. Es wäre auch möglich, dass die Methylierung von anderen Regionen zu der Kondensierung von heterochromatischen Regionen beiträgt, zum Beispiel durch erhöhte Transkription von beteiligten Proteinen oder Bildung großer Komplexe der Kernorganisation (Baubec et al. 2009). In den Versuchen in dieser Arbeit konnte nur eine Wirkung von Zebularin bestimmt werden, da die Temperatur in dem Gewächshaus während der Versuche mit 5-Azacytidin deutlich höher war als der Sollwert. Die Temperatur hat einen sehr starken Einfluss auf die meiotische Rekombination hinsichtlich Anzahl und Verteilung der Crossover. In der Gerste wird die Meiose bei Temperaturen ab 35 °C unterbrochen. Eine erhöhte Temperatur führt zu einer erhöhten Anzahl von Crossover in interstitiellen Regionen der Chromosomen (Higgins et al. 2012; Higgins et al. 2014).

5 Zusammenfassung und Ausblick

Die Erhöhung der genetischen Diversität ist wichtig für die Pflanzenzüchtung. Dafür ist die Beeinflussung der meiotischen Rekombination hinsichtlich Anzahl und Verteilung der Crossover erforderlich. In Gerste ist die meiotische Rekombination auf die euchromatischen distalen Chromosomenregionen beschränkt, wobei aber etwa 30 % der Gene außerhalb der stark rekombinierenden Bereiche liegen. In dieser Arbeit wurden Grundlagen geschaffen, um die meiotische Rekombination mit Chemikalien zu beeinflussen. Zudem wurde eine Chemikalie, welche die DNA-Methylierung inhibiert, getestet. Zur Entwicklung der Grundlage zur Anwendung von Chemikalien wurde mit Hilfe des Thymidin Analogon 5-Ethynyl-2'-deoxyuridin (EdU) eine Methode zum Injizieren von Chemikalien *in planta* in Gerstenpflanzen entwickelt. Durch diese Vorgehensweise sollte es möglich sein, Saatgut von behandelten Pflanzen zu erhalten, damit eine mögliche Veränderung in der meiotischen Rekombination auch für die Züchtung genutzt werden kann. Es zeigte sich, dass eine Konzentration von 10 mM EdU am besten ist in Verbindung mit der Injektion mit einer Spritze durch die Blatthülle, um den Raum um die sich entwickelnde Ähre mit der Lösung aufzufüllen. Eine andere Methode, bei der Fäden durch den Knoten unterhalb der Ähre gezogen wurden, wobei die Enden der Fäden dauerhaft in der EdU-Lösung waren, war ebenso verlässlich. Die Methode zum Messen der meiotischen Rekombinationshäufigkeit in einem chromosomalen Intervall anhand eines einzelnen haploiden Pollenkerns mittels der Fluoreszenzmarker-Genotypisierung funktioniert prinzipiell, jedoch sollte sie für eine höhere Erfolgsrate noch verbessert werden. Die Erfolgsrate der Fluoreszenz-PCR kann durch die Anwendung von Proteinase K, um Proteine von der DNA zu entfernen, um diese zugänglicher für die PCR zu machen erhöht werden. Weiterhin zeigt sich, dass eine vorherige PEP-PCR die Effizienz der Messung des Intervalls zwischen den beiden Markern auf 35 % erhöhen kann. Dadurch steigt jedoch der Preis pro Reaktion. Wird jedoch der Preis pro erfolgreicher Reaktion betrachtet, ist die Methode mit der PEP-PCR die kostengünstigste. Der DNA-Methylierungsinhibitor Zebularin wurde in verschiedenen Konzentrationen getestet. Ein Effekt dieser Chemikalie zeigt sich schon bei einer Konzentration von 10 μ M Zebularin. Ein konzentrationsabhängiger Effekt kann in den durchgeführten Versuchen nicht gezeigt werden, da für die Auswertung pro Behandlung jeweils nur eine Ähre berücksichtigt wurde und die Abweichungen somit nicht unbedingt auf die Konzentration der Chemikalie zurückzuführen ist, sondern möglicherweise auf den jeweiligen Injektionszeitpunkt. Diese Ergebnisse müssen jedoch durch weitere Wiederholungen mit mehr Pflanzen bestätigt werden. Zudem sollten auch geringere Konzentrationen von Zebularin angewendet werden, um möglicherweise nur einen Effekt auf die meiotische Rekombination zu erhalten, ohne dass ungewünschte Fragmente entstehen. Weiterhin muss die Methode der Chemikalienanwendung so optimiert werden, dass die Ähren in ein Stadium kommen, in dem die Pollengenotypisierung durchgeführt werden kann, damit die zytologischen

Ergebnisse durch die molekularen Marker überprüft und verifiziert werden können. Zudem ist es für eine spätere Anwendung der Chemikalien in der Pflanzenzüchtung essentiell, dass die behandelten Pflanzen Samen bilden. Durch die entwickelten Methoden können zukünftig weitere Chemikalien zur Beeinflussung der Meiose in Gerste getestet werden. Ein interessanter epigenetischer Faktor neben der DNA-Methylierung, der zu beeinflussen ist, ist zum Beispiel die Histon-Acetylierung, da dieser Faktor Einfluss auf die meiotische Rekombination hat. Zur Beeinflussung dieser Modifikationen ist zum Beispiel Trichostatin A, welches die Histon-Acetylierung beeinflusst, geeignet (Fenic et al. 2008). Weitere interessante zu beeinflussende Faktoren wären die SUMOylierung, die Ubiquinierung und die Phosphorylierung. Diese Faktoren spielen bei der meiotischen Rekombination eine wichtige Rolle (Mézard et al. 2015).

6 Literaturverzeichnis

- Aliyeva-Schnorr, Lala; Beier, Sebastian; Karafiátová, Miroslava; Schmutzer, Thomas; Scholz, Uwe; Doležel, Jaroslav et al. (2015): Cytogenetic mapping with centromeric bacterial artificial chromosomes contigs shows that this recombination-poor region comprises more than half of barley chromosome 3H. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 84 (2), S. 385–394. DOI: 10.1111/tbj.13006.
- Ashida, Taizo; Nasuda, Shuhei; Sato, Kazuhiro; Endo, Takashi R. (2007): Dissection of barley chromosome 5H in common wheat. In: *Genes & genetic systems* 82 (2), S. 123–133.
- Barry, C.; Faugeron, G.; Rossignol, J. L. (1993): Methylation induced premeiotically in *Ascobolus*. Coextension with DNA repeat lengths and effect on transcript elongation. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90 (10), S. 4557–4561. DOI: 10.1073/pnas.90.10.4557.
- Baubec, Tuncay; Pecinka, Ales; Rozhon, Wilfried; Mittelsten Scheid, Ortrun (2009): Effective, homogeneous and transient interference with cytosine methylation in plant genomic DNA by zebularine. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 57 (3), S. 542–554. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2008.03699.x.
- Bender, Judith (1998): Cytosine methylation of repeated sequences in eukaryotes. The role of DNA pairing. In: *Trends in biochemical sciences* 23 (7), S. 252–256. DOI: 10.1016/S0968-0004(98)01225-0.
- Ben-Kasus, Tsipi; Ben-Zvi, Zvi; Marquez, Victor E.; Kelley, James A.; Agbaria, Riad (2005): Metabolic activation of zebularine, a novel DNA methylation inhibitor, in human bladder carcinoma cells. In: *Biochemical pharmacology* 70 (1), S. 121–133. DOI: 10.1016/j.bcp.2005.04.010.
- Bennett, M. D. (1972): Nuclear DNA content and minimum generation time in herbaceous plants. In: *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 181 (1063), S. 109–135.
- Berchowitz, Luke E.; Francis, Kirk E.; Bey, Alexandra L.; Copenhaver, Gregory P. (2007): The role of AtMUS81 in interference-insensitive crossovers in *A. thaliana*. In: *PLoS genetics* 3 (8), S. e132. DOI: 10.1371/journal.pgen.0030132.
- Bergerat, A.; Massy, B. de; Gadelle, D.; Varoutas, P. C.; Nicolas, A.; Forterre, P. (1997): An atypical topoisomerase II from Archaea with implications for meiotic recombination. In: *Nature* 386 (6623), S. 414–417. DOI: 10.1038/386414a0.
- Bestor, Timothy; Laudano, Andrew; Mattaliano, Robert; Ingram, Vernon (1988): Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells. In: *Journal of Molecular Biology* 203 (4), S. 971–983. DOI: 10.1016/0022-2836(88)90122-2.
- Betzner, A.; Huttner, E.; Perez, P.; Doutriaux, M. P.; White, C. (2004): Composition and method for increased meiotic recombination in plants: Google Patents. Online verfügbar unter <https://www.google.com/patents/US20040111764>.
- Bird, Adrian (1992): The essentials of DNA methylation. In: *Cell* 70 (1), S. 5–8. DOI: 10.1016/0092-8674(92)90526-l.
- Bird, Adrian (2002): DNA methylation patterns and epigenetic memory. In: *Genes & development* 16 (1), S. 6–21. DOI: 10.1101/gad.947102.
- Caryl, A. P.; Armstrong, S. J.; Jones, G. H.; Franklin, F. C. (2000): A homologue of the yeast HOP1 gene is inactivated in the *Arabidopsis* meiotic mutant *asy1*. In: *Chromosoma* 109 (1-2), S. 62–71.

Chelysheva, Liudmila; Vezon, Daniel; Chambon, Aurélie; Gendrot, Ghislaine; Pereira, Lucie; Lemhemdi, Afef et al. (2012): The Arabidopsis HEI10 is a new ZMM protein related to Zip3. In: *PLoS genetics* 8 (7), S. e1002799. DOI: 10.1371/journal.pgen.1002799.

Chen, Mingsheng; Presting, Gernot; Barbazuk, W. Brad; Goicoechea, Jose Luis; Blackmon, Barbara; Fang, Guangchen et al. (2002): An integrated physical and genetic map of the rice genome. In: *The Plant cell* 14 (3), S. 537–545.

Chen, Stacy Y.; Tsubouchi, Tomomi; Rockmill, Beth; Sandler, Jay S.; Richards, Daniel R.; Vader, Gerben et al. (2008): Global analysis of the meiotic crossover landscape. In: *Developmental cell* 15 (3), S. 401–415. DOI: 10.1016/j.devcel.2008.07.006.

Cheng, J. C.; Matsen, C. B.; Gonzales, F. A.; Ye, W.; Greer, S.; Marquez, V. E. et al. (2003): Inhibition of DNA Methylation and Reactivation of Silenced Genes by Zebularine. In: *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 95 (5), S. 399–409. DOI: 10.1093/jnci/95.5.399.

Choi, Kyuha; Zhao, Xiaohui; Kelly, Krystyna A.; Venn, Oliver; Higgins, James D.; Yelina, Nataliya E. et al. (2013): Arabidopsis meiotic crossover hot spots overlap with H2A.Z nucleosomes at gene promoters. In: *Nature genetics* 45 (11), S. 1327–1336. DOI: 10.1038/ng.2766.

Choulet, Frédéric; Alberti, Adriana; Theil, Sébastien; Glover, Natasha; Barbe, Valérie; Daron, Josquin et al. (2014): Structural and functional partitioning of bread wheat chromosome 3B. In: *Science (New York, N.Y.)* 345 (6194), S. 1249721. DOI: 10.1126/science.1249721.

Cokus, Shawn J.; Feng, Suhua; Zhang, Xiaoyu; Chen, Zugen; Merriman, Barry; Haudenschild, Christian D. et al. (2008): Shotgun bisulphite sequencing of the Arabidopsis genome reveals DNA methylation patterning. In: *Nature* 452 (7184), S. 215–219. DOI: 10.1038/nature06745.

Colas, Isabelle; Macaulay, Malcolm; Higgins, James D.; Phillips, Dylan; Barakate, Abdellah; Posch, Markus et al. (2016): A spontaneous mutation in MutL-Homolog 3 (HvMLH3) affects synapsis and crossover resolution in the barley desynaptic mutant des10. In: *The New phytologist* 212 (3), S. 693–707. DOI: 10.1111/nph.14061.

Colot, Vincent; Maloisel, Laurent; Rossignol, Jean-Luc (1996): Interchromosomal Transfer of Epigenetic States in *Ascobolus*. Transfer of DNA Methylation Is Mechanistically Related to Homologous Recombination. In: *Cell* 86 (6), S. 855–864. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80161-0.

Copenhaver, G. P.; Nickel, K.; Kuromori, T.; Benito, M. I.; Kaul, S.; Lin, X. et al. (1999): Genetic definition and sequence analysis of Arabidopsis centromeres. In: *Science (New York, N.Y.)* 286 (5449), S. 2468–2474.

Copenhaver, Gregory P.; Keith, Kevin C.; Preuss, Daphne (2000): Tetrad Analysis in Higher Plants. A Budding Technology. In: *Plant Physiol.* 124 (1), S. 7–16. DOI: 10.1104/pp.124.1.7.

Crismani, Wayne; Girard, Chloé; Froger, Nicole; Pradillo, Mónica; Santos, Juan Luis; Chelysheva, Liudmila et al. (2012): FANCM limits meiotic crossovers. In: *Science (New York, N.Y.)* 336 (6088), S. 1588–1590. DOI: 10.1126/science.1220381.

Da Ines, Olivier; Abe, Kiyomi; Goubely, Chantal; Gallego, Maria Eugenia; White, Charles I. (2012): Differing requirements for RAD51 and DMC1 in meiotic pairing of centromeres and chromosome arms in Arabidopsis thaliana. In: *PLoS genetics* 8 (4), S. e1002636. DOI: 10.1371/journal.pgen.1002636.

- Daoudal-Cotterell, S.; Gallego, M. E.; White, C. I. (2002): The plant Rad50-Mre11 protein complex. In: *FEBS letters* 516 (1-3), S. 164–166.
- Dreissig, Steven; Fuchs, Jörg; Cápál, Petr; Kettles, Nicola; Byrne, Ed; Houben, Andreas (2015): Measuring Meiotic Crossovers via Multi-Locus Genotyping of Single Pollen Grains in Barley. In: *PLoS one* 10 (9), S. e0137677. DOI: 10.1371/journal.pone.0137677.
- Drouaud, Jan; Mézard, Christine (2011): Characterization of Meiotic Crossovers in Pollen from *Arabidopsis thaliana*. In: Hideo Tsubouchi (Hg.): *DNA Recombination: Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press, S. 223–249. Online verfügbar unter https://doi.org/10.1007/978-1-61779-129-1_14.
- Feng, Suhua; Jacobsen, Steven E.; Reik, Wolf (2010): Epigenetic reprogramming in plant and animal development. In: *Science (New York, N.Y.)* 330 (6004), S. 622–627. DOI: 10.1126/science.1190614.
- Fenic, Irina; Hossain, Hamid M.; Sonnack, Violetta; Tchatalbachev, Svetlin; Thierer, Felix; Trapp, Johannes et al. (2008): In vivo application of histone deacetylase inhibitor trichostatin-a impairs murine male meiosis. In: *Journal of andrology* 29 (2), S. 172–185. DOI: 10.2164/jandrol.107.003848.
- Ferdous, Maheen; Higgins, James D.; Osman, Kim; Lambing, Christophe; Roitinger, Elisabeth; Mechtler, Karl et al. (2012): Inter-homolog crossing-over and synapsis in *Arabidopsis* meiosis are dependent on the chromosome axis protein AtASY3. In: *PLoS genetics* 8 (2), S. e1002507. DOI: 10.1371/journal.pgen.1002507.
- Franklin, A. E. (1999): Three-Dimensional Microscopy of the Rad51 Recombination Protein during Meiotic Prophase. In: *THE PLANT CELL ONLINE* 11 (5), S. 809–824. DOI: 10.1105/tpc.11.5.809.
- Fuchs, Jörg; Demidov, Dmitri; Houben, Andreas; Schubert, Ingo (2006): Chromosomal histone modification patterns--from conservation to diversity. In: *Trends in plant science* 11 (4), S. 199–208. DOI: 10.1016/j.tplants.2006.02.008.
- Fung, Jennifer C.; Rockmill, Beth; Odell, Michael; Roeder, G. Shirleen (2004): Imposition of crossover interference through the nonrandom distribution of synapsis initiation complexes. In: *Cell* 116 (6), S. 795–802.
- Giraut, Laurène; Falque, Matthieu; Drouaud, Jan; Pereira, Lucie; Martin, Olivier C.; Mézard, Christine (2011): Genome-wide crossover distribution in *Arabidopsis thaliana* meiosis reveals sex-specific patterns along chromosomes. In: *PLoS genetics* 7 (11), S. e1002354. DOI: 10.1371/journal.pgen.1002354.
- Goll, Mary Grace; Bestor, Timothy H. (2005): Eukaryotic cytosine methyltransferases. In: *Annual review of biochemistry* 74, S. 481–514. DOI: 10.1146/annurev.biochem.74.010904.153721.
- Gómez, José Fernández; Wilson, Zoe A. (2012): Non-destructive staging of barley reproductive development for molecular analysis based upon external morphology. In: *Journal of experimental botany* 63 (11), S. 4085–4094. DOI: 10.1093/jxb/ers092.
- Gore, Michael A.; Chia, Jer-Ming; Elshire, Robert J.; Sun, Qi; Ersoz, Elhan S.; Hurwitz, Bonnie L. et al. (2009): A first-generation haplotype map of maize. In: *Science (New York, N.Y.)* 326 (5956), S. 1115–1117. DOI: 10.1126/science.1177837.
- Henderson, Ian R.; Jacobsen, Steven E. (2007): Epigenetic inheritance in plants. In: *Nature* 447 (7143), S. 418–424. DOI: 10.1038/nature05917.

- Higgins, James D. (2013): Analyzing Meiosis in Barley. In: Wojciech P. Pawlowski, Mathilde Grelon und Susan Armstrong (Hg.): *Plant Meiosis: Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press, S. 135–144. Online verfügbar unter http://dx.doi.org/10.1007/978-1-62703-333-6_14.
- Higgins, James D.; Armstrong, Susan J.; Franklin, F. Christopher H.; Jones, Gareth H. (2004): The Arabidopsis MutS homolog AtMSH4 functions at an early step in recombination: evidence for two classes of recombination in Arabidopsis. In: *Genes & development* 18 (20), S. 2557–2570. DOI: 10.1101/gad.317504.
- Higgins, James D.; Buckling, Ewen F.; Franklin, F. Chris H.; Jones, Gareth H. (2008): Expression and functional analysis of AtMUS81 in Arabidopsis meiosis reveals a role in the second pathway of crossing-over. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 54 (1), S. 152–162. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2008.03403.x.
- Higgins, James D.; Osman, Kim; Jones, Gareth H.; Franklin, F. Chris H. (2014): Factors underlying restricted crossover localization in barley meiosis. In: *Annual review of genetics* 48, S. 29–47. DOI: 10.1146/annurev-genet-120213-092509.
- Higgins, James D.; Perry, Ruth M.; Barakate, Abdellah; Ramsay, Luke; Waugh, Robbie; Halpin, Claire et al. (2012): Spatiotemporal asymmetry of the meiotic program underlies the predominantly distal distribution of meiotic crossovers in barley. In: *The Plant cell* 24 (10), S. 4096–4109. DOI: 10.1105/tpc.112.102483.
- Hollingsworth, N. M.; Byers, B. (1989): HOP1: a yeast meiotic pairing gene. In: *Genetics* 121 (3), S. 445–462.
- International Wheat Genome Sequencing Consortium (2014): A chromosome-based draft sequence of the hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*) genome. In: *Science (New York, N.Y.)* 345 (6194), S. 1251788. DOI: 10.1126/science.1251788.
- Jones, G. H. (1984): The control of chiasma distribution. In: *Symposia of the Society for Experimental Biology* 38, S. 293–320.
- Jones, Gareth H.; Franklin, F. Chris H. (2006): Meiotic crossing-over: obligation and interference. In: *Cell* 126 (2), S. 246–248. DOI: 10.1016/j.cell.2006.07.010.
- Jones, P. A.; Taylor, S. M. (1980): Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. In: *Cell* 20 (1), S. 85–93.
- Kankel, Mark W.; Ramsey, Douglas E.; Stokes, Trevor L.; Flowers, Susan K.; Haag, Jeremy R.; Jeddeloh, Jeffrey A. et al. (2003): Arabidopsis MET1 cytosine methyltransferase mutants. In: *Genetics* 163 (3), S. 1109–1122.
- Kass, Stefan U.; Pruss, Dmitry; Wolffe, Alan P. (1997): How does DNA methylation repress transcription? In: *Trends in Genetics* 13 (11), S. 444–449. DOI: 10.1016/S0168-9525(97)01268-7.
- Khademian, Hossein; Giraut, Laurène; Drouaud, Jan; Mézard, Christine (2013): Characterization of Meiotic Non-crossover Molecules from Arabidopsis thaliana Pollen. In: Wojciech P. Pawlowski, Mathilde Grelon und Susan Armstrong (Hg.): *Plant Meiosis: Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press, S. 177–190.
- Kleckner, Nancy (2006): Chiasma formation: chromatin/axis interplay and the role(s) of the synaptonemal complex. In: *Chromosoma* 115 (3), S. 175–194. DOI: 10.1007/s00412-006-0055-7.

- Krejci, Lumir; Altmannova, Veronika; Spirek, Mario; Zhao, Xiaolan (2012): Homologous recombination and its regulation. In: *Nucleic acids research* 40 (13), S. 5795–5818. DOI: 10.1093/nar/gks270.
- Kron, Paul; Husband, Brian C. (2012): Using flow cytometry to estimate pollen DNA content: improved methodology and applications. In: *Annals of botany* 110 (5), S. 1067–1078. DOI: 10.1093/aob/mcs167.
- Künzel, G.; Korzun, L.; Meister, A. (2000): Cytologically integrated physical restriction fragment length polymorphism maps for the barley genome based on translocation breakpoints. In: *Genetics* 154 (1), S. 397–412.
- Künzel, G.; Waugh, R. (2002): Integration of microsatellite markers into the translocation-based physical RFLP map of barley chromosome 3H. In: *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik* 105 (5), S. 660–665. DOI: 10.1007/s00122-002-0913-5.
- Lamb, N. E.; Sherman, S. L.; Hassold, T. J. (2005): Effect of meiotic recombination on the production of aneuploid gametes in humans. In: *Cytogenetic and genome research* 111 (3-4), S. 250–255. DOI: 10.1159/000086896.
- Lambing, Christophe; Franklin, F. Chris H.; Wang, Chung-Ju Rachel (2017): Understanding and Manipulating Meiotic Recombination in Plants. In: *Plant physiology* 173 (3), S. 1530–1542. DOI: 10.1104/pp.16.01530.
- Law, Julie A.; Jacobsen, Steven E. (2010a): Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. In: *Nature reviews. Genetics* 11 (3), S. 204–220. DOI: 10.1038/nrg2719.
- Law, Julie A.; Jacobsen, Steven E. (2010b): Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. In: *Nature reviews. Genetics* 11 (3), S. 204–220. DOI: 10.1038/nrg2719.
- Lindroth, A. M.; Cao, X.; Jackson, J. P.; Zilberman, D.; McCallum, C. M.; Henikoff, S.; Jacobsen, S. E. (2001): Requirement of CHROMOMETHYLASE3 for maintenance of CpXpG methylation. In: *Science (New York, N.Y.)* 292 (5524), S. 2077–2080. DOI: 10.1126/science.1059745.
- Ma, Xuhui; Wang, Qing; Wang, Yanzhi; Ma, Jieyun; Wu, Nan; Ni, Shuang et al. (2016): Chromosome aberrations induced by zebularine in triticale. In: *Genome* 59 (7), S. 485–492. DOI: 10.1139/gen-2016-0047.
- Maloisel, L.; Rossignol, J. L. (1998): Suppression of crossing-over by DNA methylation in *Ascomobolus*. In: *Genes & development* 12 (9), S. 1381–1389.
- Mancera, Eugenio; Bourgon, Richard; Brozzi, Alessandro; Huber, Wolfgang; Steinmetz, Lars M. (2008): High-resolution mapping of meiotic crossovers and non-crossovers in yeast. In: *Nature* 454 (7203), S. 479–485. DOI: 10.1038/nature07135.
- Mankouri, Hocine W.; Hickson, Ian D. (2007): The RecQ helicase-topoisomerase III-Rmi1 complex: a DNA structure-specific 'dissolvasome'? In: *Trends in biochemical sciences* 32 (12), S. 538–546. DOI: 10.1016/j.tibs.2007.09.009.
- Martienssen, R. A.; Colot, V. (2001): DNA methylation and epigenetic inheritance in plants and filamentous fungi. In: *Science (New York, N.Y.)* 293 (5532), S. 1070–1074. DOI: 10.1126/science.293.5532.1070.
- Martini, Emmanuelle; Diaz, Robert L.; Hunter, Neil; Keeney, Scott (2006): Crossover homeostasis in yeast meiosis. In: *Cell* 126 (2), S. 285–295. DOI: 10.1016/j.cell.2006.05.044.

- Mayer, Klaus F. X.; Martis, Mihaela; Hedley, Pete E.; Simková, Hana; Liu, Hui; Morris, Jenny A. et al. (2011): Unlocking the barley genome by chromosomal and comparative genomics. In: *The Plant cell* 23 (4), S. 1249–1263. DOI: 10.1105/tpc.110.082537.
- Mayer, Klaus F. X.; Waugh, Robbie; Brown, John W. S.; Schulman, Alan; Langridge, Peter; Platzer, Matthias et al. (2012): A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome. In: *Nature* 491 (7426), S. 711–716. DOI: 10.1038/nature11543.
- Melamed-Bessudo, Cathy; Levy, Avraham A. (2012): Deficiency in DNA methylation increases meiotic crossover rates in euchromatic but not in heterochromatic regions in Arabidopsis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (16), S. E981-8. DOI: 10.1073/pnas.1120742109.
- Melamed-Bessudo, Cathy; Yehuda, Elizabeth; Stuitje, Antoine R.; Levy, Avraham A. (2005): A new seed-based assay for meiotic recombination in Arabidopsis thaliana. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 43 (3), S. 458–466. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2005.02466.x.
- Mercier, Raphaël; Jolivet, Sylvie; Vezon, Daniel; Huppe, Emelyne; Chelysheva, Liudmila; Giovanni, Maité et al. (2005): Two meiotic crossover classes cohabit in Arabidopsis: one is dependent on MER3, whereas the other one is not. In: *Current biology : CB* 15 (8), S. 692–701. DOI: 10.1016/j.cub.2005.02.056.
- Mercier, Raphaël; Mézard, Christine; Jenczewski, Eric; Macaisne, Nicolas; Grelon, Mathilde (2015): The molecular biology of meiosis in plants. In: *Annual review of plant biology* 66, S. 297–327. DOI: 10.1146/annurev-arplant-050213-035923.
- Mézard, Christine; Jahns, Marina Tagliaro; Grelon, Mathilde (2015): Where to cross? New insights into the location of meiotic crossovers. In: *Trends in genetics : TIG* 31 (7), S. 393–401. DOI: 10.1016/j.tig.2015.03.008.
- Myers, Simon; Bottolo, Leonardo; Freeman, Colin; McVean, Gil; Donnelly, Peter (2005): A fine-scale map of recombination rates and hotspots across the human genome. In: *Science (New York, N.Y.)* 310 (5746), S. 321–324. DOI: 10.1126/science.1117196.
- Nicolette, Matthew L.; Lee, Kihoon; Guo, Zhi; Rani, Mridula; Chow, Julia M.; Lee, Sang Eun; Paull, Tanya T. (2010): Mre11-Rad50-Xrs2 and Sae2 promote 5' strand resection of DNA double-strand breaks. In: *Nature structural & molecular biology* 17 (12), S. 1478–1485. DOI: 10.1038/nsmb.1957.
- Nonomura, Ken-ichi; Nakano, Mutsuko; Eiguchi, Mitsugu; Suzuki, Tadzunu; Kurata, Nori (2006): PAIR2 is essential for homologous chromosome synapsis in rice meiosis I. In: *Journal of cell science* 119 (Pt 2), S. 217–225. DOI: 10.1242/jcs.02736.
- Oakeley, Edward J.; Jost, Jean-Pierre (1996): Non-symmetrical cytosine methylation in tobacco pollen DNA. In: *Plant Molecular Biology* 31 (4), S. 927–930. DOI: 10.1007/BF00019481.
- Osman, Kim; Higgins, James D.; Sanchez-Moran, Eugenio; Armstrong, Susan J.; Franklin, F. Chris H. (2011): Pathways to meiotic recombination in Arabidopsis thaliana. In: *The New phytologist* 190 (3), S. 523–544. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2011.03665.x.
- Page, Scott L.; Hawley, R. Scott (2004): The genetics and molecular biology of the synaptonemal complex. In: *Annual review of cell and developmental biology* 20, S. 525–558. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.19.111301.155141.

- Pan, Jing; Sasaki, Mariko; Kniewel, Ryan; Murakami, Hajime; Blitzblau, Hannah G.; Tischfield, Sam E. et al. (2011): A hierarchical combination of factors shapes the genome-wide topography of yeast meiotic recombination initiation. In: *Cell* 144 (5), S. 719–731. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.009.
- Perrella, Giorgio; Consiglio, M. Federica; Aiese-Cigliano, Riccardo; Cremona, Gaetana; Sanchez-Moran, Eugenio; Barra, Lucia et al. (2010): Histone hyperacetylation affects meiotic recombination and chromosome segregation in Arabidopsis. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 62 (5), S. 796–806. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2010.04191.x.
- Phillips, Dylan; Wnetrzak, Joanna; Nibau, Candida; Barakate, Abdellah; Ramsay, Luke; Wright, Frank et al. (2013): Quantitative high resolution mapping of HvMLH3 foci in barley pachytene nuclei reveals a strong distal bias and weak interference. In: *Journal of experimental botany* 64 (8), S. 2139–2154. DOI: 10.1093/jxb/ert079.
- Preuss, D.; Copenhaver, G. (2000): Chemical and physical treatment that stimulate recombination: Google Patents. Online verfügbar unter <https://www.google.com/patents/WO2000054574A3?cl=en>.
- Ramsay, Luke; Colas, Isabelle; Waugh, Robbie (2014): Modulation of Meiotic Recombination. In: Jochen Kumlehn und Nils Stein (Hg.): *Biotechnological Approaches to Barley Improvement*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, S. 311–329. Online verfügbar unter https://doi.org/10.1007/978-3-662-44406-1_16.
- Ranjha, Lepakshi; Anand, Roopesh; Cejka, Petr (2014): The *Saccharomyces cerevisiae* Mlh1-Mlh3 heterodimer is an endonuclease that preferentially binds to Holliday junctions. In: *The Journal of biological chemistry* 289 (9), S. 5674–5686. DOI: 10.1074/jbc.M113.533810.
- Rogacheva, Maria V.; Manhart, Carol M.; Chen, Cheng; Guarne, Alba; Surtees, Jennifer; Alani, Eric (2014): Mlh1-Mlh3, a meiotic crossover and DNA mismatch repair factor, is a Msh2-Msh3-stimulated endonuclease. In: *The Journal of biological chemistry* 289 (9), S. 5664–5673. DOI: 10.1074/jbc.M113.534644.
- Rostoks, Nils; Park, Yong-Jin; Ramakrishna, Wusirika; Ma, Jianxin; Druka, Arnis; Shiloff, Bryan A. et al. (2002): Genomic sequencing reveals gene content, genomic organization, and recombination relationships in barley. In: *Functional & integrative genomics* 2 (1-2), S. 51–59. DOI: 10.1007/s10142-002-0055-5.
- Rountree, M. R.; Selker, E. U. (1997): DNA methylation inhibits elongation but not initiation of transcription in *Neurospora crassa*. In: *Genes & development* 11 (18), S. 2383–2395. DOI: 10.1101/gad.11.18.2383.
- Saintenac, Cyrille; Falque, Matthieu; Martin, Olivier C.; Paux, Etienne; Feuillet, Catherine; Sourdille, Pierre (2009): Detailed recombination studies along chromosome 3B provide new insights on crossover distribution in wheat (*Triticum aestivum* L.). In: *Genetics* 181 (2), S. 393–403. DOI: 10.1534/genetics.108.097469.
- Salomé, P. A.; Bomblies, K.; Fitz, J.; Laitinen, R. A. E.; Warthmann, N.; Yant, L.; Weigel, D. (2012): The recombination landscape in *Arabidopsis thaliana* F2 populations. In: *Heredity* 108 (4), S. 447–455. DOI: 10.1038/hdy.2011.95.
- Santi, D. V.; Garrett, C. E.; Barr, P. J. (1983): On the mechanism of inhibition of DNA-cytosine methyltransferases by cytosine analogs. In: *Cell* 33 (1), S. 9–10.

- Saze, Hidetoshi (2008): Epigenetic memory transmission through mitosis and meiosis in plants. In: *Seminars in cell & developmental biology* 19 (6), S. 527–536. DOI: 10.1016/j.semcdb.2008.07.017.
- Schwacha, A.; Kleckner, N. (1995): Identification of double Holliday junctions as intermediates in meiotic recombination. In: *Cell* 83 (5), S. 783–791.
- Shinohara, Akira; Gasior, Stephen; Ogawa, Tomoko; Kleckner, Nancy; Bishop, Douglas K. (1997): *Saccharomyces cerevisiae* recA homologues RAD51 and DMC1 have both distinct and overlapping roles in meiotic recombination. In: *Genes to Cells* 2 (10), S. 615–629. DOI: 10.1046/j.1365-2443.1997.1480347.x.
- Sidhu, Gaganpreet K.; Fang, Celestia; Olson, Mischa A.; Falque, Matthieu; Martin, Olivier C.; Pawlowski, Wojciech P. (2015): Recombination patterns in maize reveal limits to crossover homeostasis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (52), S. 15982–15987. DOI: 10.1073/pnas.1514265112.
- Sinha, R. P.; Helgason, S. B. (1969): The action of actinomycin D and diepoxybutane on recombination of two closely linked loci in *Hordeum*. In: *Canadian journal of genetics and cytology. Journal canadien de genétique et de cytologie* 11 (3), S. 745–751.
- Spektrum Akademischer Verlag (2001): Meiose - Kompaktlexikon der Biologie. Heidelberg. Online verfügbar unter <http://www.spektrum.de/lexikon/biologie-kompakt/meiose/7439>, zuletzt geprüft am 09.08.2017.
- Sybenga, J. (1966): The quantitative analysis of chromosome pairing and chiasma formation based on the relative frequencies of MI configurations. V. Interchange trisomics. In: *Genetica* 37 (1), S. 481–510. DOI: 10.1007/BF01547150.
- Thompson, E. A.; Roeder, G. S. (1989): Expression and DNA sequence of RED1, a gene required for meiosis I chromosome segregation in yeast. In: *Molecular & general genetics : MGG* 218 (2), S. 293–301.
- Vega, Juan M.; Feldman, Moshe (1998): Effect of the Pairing Gene Ph1 and Premeiotic Colchicine Treatment on Intra- and Interchromosome Pairing of Isochromosomes in Common Wheat. In: *Genetics* 150 (3), S. 1199–1208. Online verfügbar unter <http://www.genetics.org/content/genetics/150/3/1199.full.pdf>.
- Wang, Kejian; Wang, Mo; Tang, Ding; Shen, Yi; Qin, Baoxiang; Li, Ming; Cheng, Zhukuan (2011): PAIR3, an axis-associated protein, is essential for the recruitment of recombination elements onto meiotic chromosomes in rice. In: *Molecular biology of the cell* 22 (1), S. 12–19. DOI: 10.1091/mbc.E10-08-0667.
- Wang, Qiang; Yin, Shen; Ai, Jun-Shu; Liang, Cheng-Guang; Hou, Yi; Chen, Da-Yuan et al. (2006): Histone deacetylation is required for orderly meiosis. In: *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 5 (7), S. 766–774. DOI: 10.4161/cc.5.7.2627.
- Wicker, Thomas; Taudien, Stefan; Houben, Andreas; Keller, Beat; Graner, Andreas; Platzer, Matthias; Stein, Nils (2009): A whole-genome snapshot of 454 sequences exposes the composition of the barley genome and provides evidence for parallel evolution of genome size in wheat and barley. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 59 (5), S. 712–722. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2009.03911.x.

- Wijnker, Erik; Jong, Hans de (2008): Managing meiotic recombination in plant breeding. In: *Trends in plant science* 13 (12), S. 640–646. DOI: 10.1016/j.tplants.2008.09.004.
- Wittich, P. E.; Lhuissier, F.G.P.; Heyting, C.; Offenberg, H. H.; Bruggeman, I. M. (2009): Homologous recombination in plants: Google Patents. Online verfügbar unter <https://www.google.com/patents/US20090031444>.
- Yamada, Takatomi; Mizuno, Ken-ichi; Hirota, Kouji; Kon, Ning; Wahls, Wayne P.; Hartsuiker, Edgar et al. (2004): Roles of histone acetylation and chromatin remodeling factor in a meiotic recombination hotspot. In: *The EMBO journal* 23 (8), S. 1792–1803. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600138.
- Yelina, Nataliya E.; Ziolkowski, Piotr A.; Miller, Nigel; Zhao, Xiaohui; Kelly, Krystyna A.; Muñoz, Daniela F. et al. (2013): High-throughput analysis of meiotic crossover frequency and interference via flow cytometry of fluorescent pollen in *Arabidopsis thaliana*. In: *Nature Protocols* 8 (11), S. 2119.
- Yelina, Natasha; Diaz, Patrick; Lambing, Christophe; Henderson, Ian R. (2015): Epigenetic control of meiotic recombination in plants. In: *Science China Life Sciences* 58 (3), S. 223–231. DOI: 10.1007/s11427-015-4811-x.
- ZADOKS, J. C.; CHANG, T. T.; KONZAK, C. F. (1974): A decimal code for the growth stages of cereals. In: *Weed Res* 14 (6), S. 415–421. DOI: 10.1111/j.1365-3180.1974.tb01084.x.
- Zhang, L.; Cui, X.; Schmitt, K.; Hubert, R.; Navidi, W.; Arnheim, N. (1992): Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic analysis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (13), S. 5847–5851.
- Zhang, Xiaoyu; Yazaki, Junshi; Sundaresan, Ambika; Cokus, Shawn; Chan, Simon W-L; Chen, Huaming et al. (2006): Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in *Arabidopsis*. In: *Cell* 126 (6), S. 1189–1201. DOI: 10.1016/j.cell.2006.08.003.
- Zickler, D.; Kleckner, N. (1999): Meiotic chromosomes: integrating structure and function. In: *Annual review of genetics* 33, S. 603–754. DOI: 10.1146/annurev.genet.33.1.603.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Überblick des Ablaufes der Meiose (Mézard et al. 2015). Homologe Chromosomen wurden in grün oder blau dargestellt.....	2
Abbildung 3: Stadien der Meiose in Pflanzen (Spektrum Akademischer Verlag 2001).	5
Abbildung 4: Schema der Verteilung des Gengehaltes und der meiotischen Rekombinationsrate über der physikalischen Karte der Gerstenchromosoms 3H (Aliyeva-Schnorr et al. 2015)	9
Abbildung 5: chemische Struktur von Cytidin, dessen methylierter Form, 5-Methylcytidin und den Methylierungsinhibitoren 5-Azacytidin und Zebularin (Baubec et al. 2009).	14
Abbildung 6: EdU-Injektionsmethoden	18
Abbildung 7: Positionen der getesteten Fluoreszenzmarker gezeigt als vertikale Striche entlang des Gerstenchromosoms 3H.....	22
Abbildung 8: Darstellung der Ergebnisse der quantitativen Echtzeit-PCR.....	23
Abbildung 9: Schema für das Sortieren von einzelnen haploiden Pollenkernen mittels Durchflusszytometrie (Dreissig et al. 2015).	27
Abbildung 10: Ablauf der Meiose in Gerste.	28

Abbildung 11: Meiotische Chromosomen der Gerste mit EdU (grün) markiert und mit DAPI (blau) angefärbt	31
Abbildung 12: Gegenüberstellung von komplett (a, c, e) markierter und nur teilweise (b, d, f) mit EdU (grün) markierter DNA in meiotischen Chromosomen der Gerste	32
Abbildung 13: Diakinesen und Metaphasen I von mit Zebularin behandelten Ähren der Gerste aus Versuch 1	35
Abbildung 14: Meiotische Chromosomen von mit Zebularin behandelten Ähren der Gerste aus Versuch 2	37
Abbildung 15: Diakinesen und Metaphasen I von Ähren der Kontrollen aus Versuch 3	38
Abbildung 16: Darstellung der Fluoreszenzsignale der Marker von Assay 1 und Assay 28 bei einer DNA-Konzentration von 20 pg/μl für die PCR-Reaktion.....	39
Abbildung 17: Darstellung der Fluoreszenzsignale der Marker von Assay 1 und Assay 28 bei einer DNA-Konzentration von 2 pg/μl für die PCR-Reaktion.....	40
Abbildung 18: Darstellung der Fluoreszenzsignale der Marker von Assay 1 bei Blatt- und Pollenkernen als verwendetes Template. Pollenkern wurden anhand eines geringen Streulichtwertes sortiert	42
Abbildung 19: Darstellung der Fluoreszenzsignale der Marker von Assay 1 bei Blatt- und Pollenkernen als verwendetes Template. Pollenkernen wurden anhand eines hohen Streulichtwertes sortiert.....	42
Abbildung 20: Darstellung der Rate der Reaktionen, in denen beide Marker auf einem haploiden Pollenkern simultan funktioniert haben bei den unterschiedlichen Vorbehandlungen.....	46
Abbildung 21: Externe Wachstumsstadien nach der Zadoks-Skala (ZADOKS et al. 1974) mit Ergänzung der Zwischenstadien 33,5 und 34,5 durch Gómez und Wilson (2012).	48

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Durchschnittliche Anzahl an zytologisch ermittelten Chiasmata in den einzelnen Chromosomen der Gerste (Colas et al. 2016).	8
Tabelle 2: Angewandte Lösungen im ersten Versuch.	19
Tabelle 3: Angewandte Lösungen im zweiten Versuch.....	19
Tabelle 4: Angewandte Lösungen im dritten Versuch	20
Tabelle 5: Reaktionsansatz Detektionslösung EdU Click- 488 (Carl Roth).....	21
Tabelle 6: Thermocycler Programm für die Fluoreszenz-PCR	23
Tabelle 7: Reaktionsansatz Fluoreszenz-PCR	23
Tabelle 8: Reaktionsansatz Fluoreszenz-PCR mit Proteinase K-Behandlung	24
Tabelle 9: Reaktionsansatz Fluoreszenz-PCR mit Mikrowellen- und Proteinase K-Behandlung.....	25
Tabelle 10: Reaktionsansatz PEP-PCR	25
Tabelle 11: Thermocycler Programm für die PEP-PCR	26
Tabelle 12: Reaktionsansatz Fluoreszenz-PCR mit Proteinase K-Behandlung und vorhergehender PEP-PCR.....	26
Tabelle 13: Rate an Anomalien in Diakinese bzw. Metaphase I Zellkernen der Gerste in behandelten Pflanzen aus den ersten beiden Versuchen.	33
Tabelle 14: Erfolgsraten der Fluoreszenz-PCR bei verschiedenen DNA-Konzentrationen.....	39
Tabelle 15: Erfolgsraten der Fluoreszenz-PCR mit Blatt- und Pollenkernen (Assay 1) bei einem Gesamtreaktionsvolumen von 2 μl.	41

Tabelle 16: Erfolgsraten der Fluoreszenz-PCR mit Blatt- und Pollenkernen (Assay 1) mit Unterscheidung des Streulichtwertes beim Sortieren mit dem Durchflusszytometer (vegetative und generative Pollenkern) bei einem Gesamtreaktionsvolumen von 2 µl.....	41
Tabelle 17: Erfolgsraten der Fluoreszenz-PCR mit Blatt- und Pollenkernen (Assay 1 und Assay 28) bei einem Gesamtreaktionsvolumen von 2 µl.	43
Tabelle 18: Erfolgsraten der Fluoreszenz-PCR mit Blatt- und Pollenkernen (Assay 1 und Assay 28) bei einem Gesamtreaktionsvolumen von 10 µl mit vorheriger Proteinase K-Behandlung der sortierten Kerne. Durchschnittliche Werte aus drei zeitlich voneinander unabhängigen Versuchen.....	44
Tabelle 19: Erfolgsraten der Fluoreszenz-PCR mit Blatt- und Pollenkernen (Assay 1 und Assay 28) bei einem Gesamtreaktionsvolumen von 2 µl mit vorheriger Proteinase K-Behandlung der sortierten Kerne. Durchschnittliche Werte aus 2 zeitlich voneinander unabhängigen Versuchen bei den Blattkernen.....	44
Tabelle 20: Erfolgsraten der Fluoreszenz-PCR mit Blatt- und Pollenkernen (Assay 1 und Assay 28) bei einem Gesamtreaktionsvolumen von 10 µl mit vorheriger Wärmebehandlung mit der Mikrowelle und Proteinase K-Behandlung der sortierten Kerne.	45
Tabelle 21: Erfolgsraten der Fluoreszenz-PCR mit Blatt- und Pollenkernen (Assay 1 und Assay 28) bei einem Gesamtreaktionsvolumen von 10 µl mit vorheriger PEP-PCR mit 1 U Taq-Polymerase.....	45
Tabelle 22: Erfolgsraten der Fluoreszenz-PCR mit Blatt- und Pollenkernen (Assay 1 und Assay 28) bei einem Gesamtreaktionsvolumen von 10 µl mit vorheriger PEP-PCR mit 0,2 U Taq-Polymerase.....	46
Tabelle 23: Größe der Ähren in Zusammenhang mit den externen Wachstumsstadien (Gómez und Wilson 2012).....	48

9 Anhang

Anhang 1

Primersequenzen

Oligoname	Sequenz	Farbe	Quencher	Chromosom	Physikalische Position (bp)	SNP Sequenz
Assay1-F	5'-TCCTTCAATGATCCCAGACA-3'			3H	445699400	CAGGTCTCATCTACCAAATTTGAAGTACCTCCTTCA ATGATCCCAGACATGTAACCACTTTCAAATTTAGC CTTGTTGGCAAATATTTCTAGTGAACCTTGTATAT TCTGATTTCTGCC[A/G]AAAGAATTATGCATGAAG AAGCACAATTCTTAGTCTACAGCTTGTGGTTCTGC ATTTGAATCTCAAACCTGCCTCAAAGTTATGCAG AGAAGTCAAGTTCAGCTTCCACAAAGAGAAGA
Assay1-R	5'-TCAAATGCAGAACCACAAGC-3'					
Assay1-SNP-A	5'- [HEX]CTGATTTCTGCCAAAAGAATTATGC ATG[BHQ1]-3'	HEX	BHQ1			
Assay1-SNP-G	5'- [FAM]CTGATTTCTGCCAAAAGAATTATG CATG[BHQ1]-3'	FAM	BHQ1			

Assay28-F	5'-CTGCAAGCAGGATGCCTCTA-3'			3H	117734280	TACAACCGAGATCCTGCAAGCAGGATGCCTCTAGC TAGCACAACCGGATTATTGATCATCATAACAGACAT CCATAACTTAAGAACTTTACAGAACCAAATATCA GCAGCTAATAATATA[A/G]TTAAGCGCAACCACGA CGTTATTATTTTATACAGTAATAAAAATACAAAAA GGAACGCAGCGCACGAACTTAGCAAGAGCTACAT GCATGTAGTAGAAGCAGAAACCCGACTTCTACTTC
Assay28-R	5'-GTGCGCTGCGTTCCTTTT-3'					
Assay28-SNP-A	5'- [TxRed]AGCTAATAATATAATTAAGCGCA ACCACGA[BHQ2]-3'	TXRED	BHQ2			
Assay28-SNP-G	5'- [CY5]AGCTAATAATATAGTTAAGCGCAAC CACGA[BHQ2]-3'	CY5	BHQ2			

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die Bachelorarbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Das bearbeitete Thema wurde nicht schon früher im Rahmen einer anderen Arbeit behandelt und/oder anderswo als Prüfungsarbeit eingereicht.

Ort, Datum, Unterschrift