

استفاده از روش FISH^(۱) برای تعیین جایگاه دو قطعه تکراری
DNA روی کروموزوم‌ها و رشته‌های منبسط DNA گونه وحشی
Beta procumbens در گیاهان مونوسومیک با کروموزوم
اضافی^(۲)

FISH for localisation of two repeat families on *Beta*
procumbens chromosomes and extended DNA fibres in a
series of monosomic additions*

محمود مصباح

عضو هیئت علمی مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندر قند

چکیده

محل فیزیکی و ترتیب قرار گرفتن دو قطعه تکراری DNA بنام‌های PB6-4 و OPX2 خاص
گروه *Procumbentes* روی کروموزوم‌های گونه وحشی *B. procumbens* با استفاده از روش

1- Fluorescence In Situ Hybridisation

2- Monosomic addition lines

* این تحقیق در قالب پایان‌نامه دکترا و با حمایت مالی مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندر قند توسط نگارنده و با همکاری
Wouter Lange, Theo S.M. De Bock, Hans De Jong در دپارتمان ژنتیک دانشگاه واگنینگن هلند
انجام گرفته است.

B. procumbens و یک سری گیاهان مونوسومیک با کروموزوم اضافی *B. procumbens* در مرحله متافاز استفاده شد. با استفاده از این روش مشخص گردید که پروب PB6-4 عمدتاً در ناحیه سانترومر تمام کروموزومها قرار دارد، ضمناً تعداد جایگاههای این پروب روی هریک از کروموزومها نیز متفاوت است. در مقایسه با PB6-4 مشخص شد که پروب OPX2 در طول تمام کروموزومها پراکنده بود و تعداد جایگاههای پیوندی آن نیز در هر یک از کروموزومها متفاوت است. نتیجه هیبرید همزمان این دو پروب با کروموزومهای میتوزی گیاهان مونوسومیک با کروموزوم اضافی ایجاد علائم فلورسنسی بود که تنها روی یکی از ۱۹ کروموزوم این گیاهان مشاهده گردید که خود نشان دهنده عدم هومولوژی بین این پروبها و ژنوم *B. vulgaris* می باشد. تشکیل سیگنالهای فلورسنسی تنها روی یکی از کروموزومها این امکان را فراهم آورد تا بتوان ضمن تشخیص کروموزوم اضافه شده از کروموزومهای *B. vulgaris* الگوی پراکندگی این قطعات تکراری DNA را روی کروموزومهای انفرادی *B. procumbens* مشخص و کاریوتایپ این گونه را تعیین نمود. با توجه به اطلاعات موجود در خصوص وجود لینکاژ بین PB6-4 و جایگاه ژنی Hsl که مقاومت به نماتد چغندر قند را کنترل می نماید نتیجه گیری شد که این جایگاه ژنی احتمالاً در ناحیه سانترومری کروموزوم یک *B. procumbens* قرار دارد. نتایج این تحقیق با بررسی های مولکولی که قبلاً صورت گرفته است و منجر به تغییر نام تعدادی از کروموزومهای گونه *B. procumbens* شده است کاملاً مطابقت دارد. هیبرید پروب PB6-4 با رشته های منبسط DNA (Extended DNA fibers) که از هشت نوع گیاه مونوسومیک اضافه *B. procumbens* استخراج شد مشخص نمود که هریک از کروموزومهای بیگانه دارای تعداد متفاوتی از تکرار PB6-4 می باشد، ضمناً تعداد و اندازه توالی های PB6-4 نیز در هر کروموزوم متفاوت است.

مقدمه

تجزیه و تحلیل کروموزومهای گیاهی روش مؤثر برای شناخت تکامل ژنوم، نو ترکیبی در میوز و پایداری کاریوتیپ می باشد (۱۲). از روش FISH برای شناسایی کروموزومها، مشخص نمودن نارسایی های کروموزومی و تعیین موقعیت توالی های خاص DNA روی کروموزومها جهت ترسیم نقشه های ژنتیکی بطور وسیع استفاده می شود (۲۷ و ۲۲). از زمانی که این روش ابداع شد کاربرد آن در مطالعات ژنوم گیاهان زراعی بسرعت توسعه یافت (۱۵، ۱۴، ۱۲، ۲۵ و ۳۸) و امکان تشخیص کروموزومهای

والدین در هیبریدهای بین گونه‌ای و بک کراس‌ها میسر گردید. از این روش برای تشخیص کروموزوم‌ها و یا قطعات کوچکی از کروموزوم بیگانه که به ژنوم مورد نظر اضافه شده است و حاوی صفات مهمی هستند، نیز استفاده شده است (۱۲).

در حال حاضر مشاهده مستقیم توالی‌های تکراری و یا منفرد DNA روی کروموزوم‌های گونه‌های مختلف با استفاده از این روش ممکن گردیده است. اگر چه این روش را می‌توان برای کروموزوم‌های میتوزی در مرحله متافاز بکار برد ولی مشاهده DNA مورد نظر روی کروموزوم‌های میتوزی در مرحله پروفاز و رشته‌های منبسط DNA در مرحله انترفاز (Extended DNA fibers) دقیق‌تر صورت می‌گیرد (۴۱، ۴۲، ۳۵، ۶).

سه گونه وحشی گروه *Procumbentes* بنام‌های *B. webbiana* Mog و *B. procumbens* Ch.Sm منابع ژنتیکی با ارزشی برای اصلاح چغندرهای زراعی می‌باشند (۲۱ و ۳۹). گیاهان مونوسومیک با کروموزوم اضافه یعنی گیاهان ۱۹ کروموزومی که دارای ۱۸ کروموزوم *B. vulgaris* و یک کروموزوم اضافه شده از گونه‌های *Procumbentes* می‌باشند باهدف انتقال ژنهای مقاوم به نماتد (*Heterodera schachtii* Schm.) به ژنوم چغندرهای زراعی از طریق تلاقیهای بین گونه‌ای تولید شده است (۸، ۹، ۲۱، ۳۰، ۳۱، ۳۶، ۳۷ و ۱۶) کروموزوم‌های اضافه شده از طریق مطالعات فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی، سیتولوژیکی و مولکولی شناسایی و خصوصیات هریک از آنها تعیین گردیده است (۲۴، ۴۰، ۲۹، ۲۸، ۲۶، ۲۰ و ۴). چندین قطعه تکراری DNA خاص گروه *Procumbentes* شناسایی و جدا شده که برای تشخیص گیاهان ۱۹ کروموزومی از ۱۸ کروموزومی، شناسایی و تعیین خصوصیات هریک از کروموزوم‌های خارجی و یا قطعات کوچک کروموزومی خارجی که از طریق هیبریداسیون بین گونه‌ای و بک کراس به ژنوم *B. vulgaris* اضافه شده است مورد استفاده قرار گرفته است (۳۳، ۱۷، ۲۸، ۲۹، ۱۸، ۱۹ و ۲۴). چنانچه این قطعات تکراری DNA از نظر فیزیکی به یک ژن مورد نظر نزدیک باشند می‌توانند بعنوان نشانگر سیتولوژیکی برای تعیین جایگاه ژن در روی کروموزوم اضافی مورد استفاده قرار گیرند. مثال بارز آن قطعات تکراری OPX2 و Sat-121 می‌باشند که در مجاورت جایگاه Hsl که مقاومت به نماتد چغندر قند را کنترل می‌نماید قرار گرفته‌اند. این موضوع از طریق

بررسی کلونهای YAC و λ در گیاهانی با قطعه کروموزومی اضافی (گیاهانی که دارای ۱۸ کروموزوم *B. vulgaris* و قسمت کوچکی از کروموزوم گونه وحشی *Procumbentes* می باشند)^(۱) به اثبات رسیده است (۲۷، ۲۸، ۲۹، ۱۸، ۱۹ و ۲). وجود PB6-4 روی تمام کروموزوم‌های دو گونه *B. procumbens* و *B. patellaris* قبلاً با استفاده از روش Squash-blot به تأیید رسیده است (۲۳) و روش انگست نگاری DNA نیز با استفاده از این پروب و دو پروب دیگر (OPX2 & Sat-121) برای شناسایی و تعیین خصوصیات هر یک از کروموزوم‌های این دو گونه بکار رفته است (۲۳ و ۲۴). بعلاوه ساختمان مولکولی، وضعیت ژنومی و پراکندگی دو قطعه تکراری دیگر خاص *Procumbentes* نیز مورد بررسی قرار گرفته است و روش فیش نیز برای تعیین نقشه فیزیکی این دو پروب روی کروموزوم‌های میتوزی *B. procumbens* در مرحله متافاز مورد استفاده قرار گرفته است (۳۲).

در این تحقیق، روش چند رنگی فیش برای ترسیم نقشه فیزیکی و تعیین خصوصیات دو قطعه تکراری DNA (OPX2 & PB6-4) روی کروموزوم‌های گونه وحشی *B. procumbens* و گیاهان مونوسومیک آن توضیح داده شده است. اطلاعات بدست آمده از جایگاه این قطعات تکراری روی کروموزوم‌های خارجی برای تعیین کاریوتایپ گونه وحشی *B. procumbens* مورد استفاده قرار گرفته است. اندازه توالی‌های PB6-4 روی رشته‌های منبسط DNA هریک از کروموزوم‌های بیگانه نیز تعیین شده است که مورد بحث قرار خواهد گرفت.

مواد و روشها

مواد گیاهی

مواد گیاهی مورد استفاده در این تحقیق شامل یک سری گیاهان مونوسومیک ۱۹ کروموزومی (گیاهان دیپلوئید *B. vulgaris* با یک کروموزوم بیگانه از گونه *B. procumbens*) بود، که هر کدام یکی از کروموزوم‌های گونه *B. procumbens* را حمل می نمایند (۴۰) و مطابق نامگذاری جدید (۲۴) طبقه بندی شده اند. گیاهان مونوسومیک

با کروموزوم اضافه شماره ۱ تحت دو فامیل D3-2-35 و D1-2-13 مشخص شده‌اند. فامیل D3-2-35 قبلاً به اشتباه تحت عنوان مونوسومیک با کروموزوم اضافی شماره ۶ نامگذاری شده بود. گیاهان مونوسومیک با کروموزوم اضافی شماره ۴ دارای خاصیت کشندگی بوده لذا در این بررسی مورد استفاده قرار نگرفت. از گونه *B. procumbens* نیز بعنوان شاهد استفاده شد. گیاهان مربوط به هریک از فامیل‌های ۱۹ کروموزومی تحت شرایط گلخانه‌ای کشت و گیاهان ۱۹ کروموزومی در میان فامیل‌های در حال تفرق با استفاده از پروب PB6-4 و روش Squash-blot شناسایی و از گیاهان ۱۸ کروموزومی جدا گردیدند (۲۳).

تهیه پروب‌های تکرار (۱) DNA

پروپ‌های PB6-4 & OPX2 که هر دو خاص گروه *Procumbentes* در جنس چغندر می‌باشند در این بررسی مورد استفاده قرار گرفتند. پروب PB6-4 از میان مجموعه کلون‌های ژنومی *B. procumbens* جدا گردیده است (۸). اندازه این پروب ۱۷۰۰ bp است که خود حاوی چندین کپی از قطعه تکراری DNA به نام Sat-121 می‌باشد که به وسیله توالی‌های نامعلومی از یکدیگر جدا شده‌اند. پروب OPX2 نیز یک قطعه تکراری DNA با اندازه ۱۲۰۰ bp می‌باشد که تخمین زده شده است حدود ۱۰۰ تا ۵۰۰ بار در ژنوم *B. patellaris* تکرار شده است. این پروب با استفاده از روش RAPD^(۲) و پرایمر 5'-TTCCGCCACC-3' شناسایی و جدا گردیده است (۲۸). تعداد کپی‌های این پروب در ژنوم گونه‌های گروه *Procumbentes* نسبت به پروب اول کمتر است. پروب PB6-4 در پلاسمید Puc19 و پروب OPX2 در پلاسمید SK+ کلون شده‌اند. این کلون‌های باکتریایی در محیط کشت LB حاوی ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر آمپی سیلین کشت شدند و سپس پلاسمیدها با استفاده از روش استاندارد^(۳) استخراج شدند. پلاسمید Puc19 با آنزیم محدود کننده EcoRI و پلاسمید SK+ با آنزیم‌های محدود کننده HindIII و EcoRI برش

1- Repetitive DNA probes

2- Random amplified polymorphic DNA

3- Minipreparation

داده شدند و قطعات DNA کلون شده بوسیله الکتروفرز از پلاسمیدهای ناقل جدا و پس از خالص سازی با Biotin-16-dUTP و یا Digoxigenin-11-dUTP نشانه دار شدند.

تهیه کروموزوم های میتوزی

برای تهیه کروموزوم های میتوزی در مرحله متافاز از قسمت انتهایی مریستم ریشه چه های جوان استفاده شد. ابتدا این نمونه ها بمدت دو و نیم ساعت در محلول ۲ میلی مول هیدروکسی کینولین-(۱) و در دمای ۱۷ درجه سانتیگراد قرار داده شدند و بمدت یک شب در محلول اسید استیک- اتانول (۱:۳ v/v) تثبیت شدند. نمونه ها سپس بمدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در محلول آنزیمی شامل cellulase ۳٪، cytohelicase ۳٪، pectolyase ۲٪ در ده میلی مول بافر - سیتريت با pH=۴/۵ قرار داده شدند. مراحل بعدی مطابق دستورالعملی که توسط Zhong و همکارانش (1996a) توضیح داده شده است انجام گرفت.

تهیه رشته های منبسط DNA (۲)

هسته های سلولی از برگ های جوان جدا و در محلول ۵۰٪ (v/v) گلیسرول در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد (۴۲) نگهداری شدند. هسته های سلولی جدا شده روی لام ها پخش و در مجاورت هوای آزاد خشک شدند. با استفاده از بافر مخصوص (7 mM Tris, pH ۱۰۰, ۵ mM EDTA, ۵٪ SDS) طی مدت ۱۰ دقیقه غشاء هسته ها شکافته و DNA بصورت رشته های طویل روی لام هایی که بطور مورب قرار گرفته بودند آزاد شدند. رشته های منبسط DNA سپس با استفاده از محلول اسید استیک- اتانول (۱:۳ v/v) کاملاً روی لام ها ثابت و در مجاورت هوای آزاد خشک شدند (۴۳، ۶).

روش فیش FISH

کروموزوم های میتوزی در مرحله متافاز که روی لام ها ثابت شده بودند ابتدا

1- 8-Hydroxyquinoline

۲- Extended DNA fibre رشته های کروموزومی در مرحله انترفاز است.

بطور متوالی با محلول‌های زیر آغشته شدند.

۱- آنزیم RNAaseA ($100 \mu\text{g/ml}$) عاری از DNAase محلول در 2XSSC به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد

۲- pepsin ($5 \mu\text{g/ml}$) محلول در 0.1 M HCl به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد

۳- Alkaline formaldehyde (۱٪ (w/v) محلول در بافر بوریت با $\text{pH} = 8.6$ به مدت ده دقیقه در دمای محیط. پس از هر مرحله نمونه‌ها سه بار به مدت پنج دقیقه در محلول 2XSSC شسته و سپس به ترتیب در الکل ۷۰٪ و ۹۰٪ و ۹۸٪ قرار داده شدند. نمونه‌ها سپس در مجاورت هوای آزاد خشک شدند. نمونه‌های مربوط به رشته‌های منبسط DNA بطور مستقیم و بدون استفاده از pepsin، formaldehyde و RNAase مورد استفاده قرار گرفتند. برای هریک از نمونه‌ها ۲۰ میکرولیتر از ترکیب زیر استفاده شد:

50% formamide, 2XSSC, 10% sodium dextran sulfate, 50mM phosphate buffer, pH 7, 1-2ng/ μl DNA probe, 50-100 ng/ μl Salmon Sperm DNA

کروموزوم‌ها و پروب‌های مورد نظر OPX2 و PB6-4 به مدت دو دقیقه در دمای

۸۰ درجه سانتیگراد حرارت داده شدند و سپس نمونه‌ها به مدت یک شب در دمای ۳۷

درجه سانتیگراد قرار گرفتند تا پیوند بین کروموزوم‌ها و پروب‌ها صورت گیرد. بازیابی

و تقویت علائم پیوندی فلورسنت طبق دستورالعمل شرکت تولید کننده انجام گرفت

(Boehringer, Mannheim, Germany) پروبی که با Digoxigenin نشانه دار شده بود با

استفاده از آنتی‌بادی‌های Anti-digoxigenin متصل به فلورسین و بوسیله آنتی‌بادی‌های

Rabbit-anti-sheep متصل به فلورسین تقویت شدند. پروبی که با Biotin نشانه دار شده

بود با Avidin-TexasRed بازیابی و با Avidin-TexasRed و Goat anti-avidin متصل به

Biotin تقویت شدند. کروموزوم‌ها سپس با DAPI رنگ آمیزی و پس از اضافه نمودن

محلول Vectashield (Vectalaboratory) نمونه‌ها زیر میکروسکوپ فلورسنت مجهز به

فیلترهای مخصوص مورد مطالعه قرار گرفتند. پس از عکس برداری از نمونه‌های مورد

نظر تصاویر بدست آمده در کامپیوتر ثبت و با برنامه‌های گرافیکی مخصوص بطور

دقیق مورد مطالعه قرار گرفتند.

نتایج

استفاده از روش فیش در گونه *B. procumbens* و مونوسومیک‌های حاصل از آن پیوند پروب PB6-4 (نشانه دار شده با Digoxigenin) با کروموزوم‌های میتوزی *B. procumbens* در مرحله متافاز مشخص نمود که این قطعه تکراری در ناحیه سانترومر تمام کروموزوم‌ها متمرکز بوده و تعداد جایگاه‌های آن در کروموزوم‌های مختلف بین ۴ تا ۱۲ جایگاه متغیر می‌باشد، بعلاوه جایگاه‌های پراکنده آن نیز روی یک یا هر دو بازوی پنج نوع کروموزوم مشاهده گردید. پیوند پروب OPX2 با کروموزوم‌های این گونه مشخص نمود که جایگاه‌های این قطعه تکراری متفاوت از جایگاه‌های PB6-4 بوده و عمدتاً در طول تمام کروموزوم‌ها پراکنده می‌باشد، ضمناً تعداد جایگاه‌های این پروب در کروموزوم‌های مختلف بین ۲ تا ۱۰ جایگاه متغیر می‌باشد. نتیجه هیبرید همزمان این دو پروب با کروموزوم‌ها، مشابه هیبرید جداگانه هریک از پروب‌ها بود، ضمناً مشخص گردید که جایگاه‌های این قطعات تکراری حداقل در هشت نوع کروموزوم متفاوت می‌باشد (عکس شماره 1A, 1B). روی یک جفت کروموزوم هریک با هشت جایگاه OPX2، دو جایگاه مشاهده گردید که با جایگاه‌های PB6-4 مشترک بودند.

پیوند همزمان OPX2 و PB6-4 با کروموزوم‌های حاصل از مونوسومیک‌های *B. procumbens* مشخص نمود که این پروب‌ها تنها با یکی از ۱۹ کروموزوم موجود در گیاهان مونوسومیک پیوند برقرار می‌نمایند. این نشان‌دهنده آن است که پروب‌ها خاص گونه *B. procumbens* بوده و با ژنوم *B. vulgaris* هومولوژی ندارند. نتیجه پیوند PB6-4 با کروموزوم گیاهان مونوسومیک که حاوی کروموزوم شماره ۸ *B. procumbens* می‌باشند در عکس 1C نشان داده شده است. ابتدا سعی گردید که محل قرار گرفتن علائم فلورسنت مربوط به این پروب‌ها روی کروموزوم‌های گونه وحشی مشخص شود، ضمناً با توجه به اینکه کروموزوم‌ها در مرحله متافاز بسیار کوچک و فشرده می‌باشند سعی گردید تا کروموزوم گیاهان مونوسومیک در مرحله پروفاز و همچنین هسته‌های اینترفاز نیز مورد مطالعه قرار گیرند تا بتوان بطور دقیق تعداد علائم فلورسنتی مربوط به هریک از پروب‌ها را شمارش نمود. از آنجایی که PB6-4 و OPX2 خاص گونه *B. procumbens* بوده و تنها با کروموزوم بیگانه اضافه شده در گیاهان مونوسومیک

هیبرید می‌شوند این امکان فراهم آمد تا بتوان کروموزوم‌های اضافه شده را در بین کروموزوم‌های *B. vulgaris* شناسایی و مرفولوژی هر یک از آنها را با کروموزوم‌های میتوزی *B. procumbens* مقایسه نمود. ضمناً طول کروموزوم‌های *B. procumbens* در سلول‌های جداگانه اندازه‌گیری شد تا بتوان کاریوتیپ این گونه را بر اساس اطلاعات بدست آمده از هر یک از کروموزوم‌های موجود در مونوسومیک‌ها تعیین نمود (عکس 1D).

مشخصات کلی کروموزوم‌های گونه *B. procumbens* بشرح زیر می‌باشد:

کروموزوم ۱: از گیاهان مونوسومیک با کروموزوم اضافی شماره ۱ دو فامیل D 3-2-3 و D1-2-13) مورد آزمایش قرار گرفتند. جایگاه علائم پیوندی هر دو پروب در این دو فامیل مشابه بود. محل سانترومر این کروموزوم نیمه انتهایی و متوسط طول آن ۴/۳ میکرومیلیمتر و دومین کروموزوم بزرگ گونه *B. procumbens* می‌باشد. ده علامت PB6-4 و دو علامت OPX2 روی این کروموزوم مشاهده گردید. از ده علامت PB6-4 شش علامت در ناحیه سانترومر، دو علامت روی بازوی کوچک نزدیک به محل سانترومر و دو علامت دیگر در انتهای بازوی بلند این کروموزوم قرار داشت. دو علامت OPX2 روی بازوی کوتاه این کروموزوم مشاهده گردید. حداکثر تعداد علائم PB6-4 و OPX2 در سلول‌های اینترفاز به ترتیب ده و چهار علامت بود.

کروموزوم شماره ۲ (Au5-1-7): طول این کروموزوم ۲/۳ میکرومیلیمتر و محل سانترومر آن نیمه انتهایی است. شش علامت PB6-4 و دو علامت OPX2 روی این کروموزوم مشاهده شد. تمام علائم PB6-4 در محل سانترومر و یا در اطراف آن و روی بازوی کوتاه قرار داشتند. ظاهراً دو جایگاه OPX2 با جایگاه‌های PB6-4 مشترک بودند. حداکثر تعداد علائم PB6-4 و OPX2 در سلول‌های اینترفاز به ترتیب ده و چهار علامت بود.

کروموزوم ۳ (D3-2-17): طول این کروموزوم ساب متاسانتریک معادل ۲/۹ میکرومیلیمتر است و دارای دو زایده کوتاه در انتهای بازوی بلند می‌باشد. شش جایگاه PB6-4 در محل سانترومر، دو جایگاه OPX2 روی بازوی بلند و دو جایگاه دیگر OPX2 روی بازوی کوتاه این کروموزوم مشاهده شد. حداکثر تعداد علائم PB6-4 و OPX2 در

سلولهای انترفاز به ترتیب شش و چهار علامت بود.

کروموزوم ۴: باتوجه به اینکه کروموزوم شماره ۴ در گیاهان مونوسومیک اثر کشندگی دارد لذا خصوصیات این کروموزوم در گیاهان ۱۹ کروموزومی مورد مطالعه قرار نگرفت و تنها اطلاعات بدست آمده از سلولهای گونه *B. procumbens* برای تعیین خصوصیات این کروموزوم استفاده شد. طول این کروموزوم متاسانتريک ۲/۹ میکرومیلیمتر است و دارای دو زائده کوتاه انتهایی در بازوی بلند می باشد. تعداد چهار جایگاه PB6-4 در محل سانترومر و یا اطراف آن و دو جایگاه دیگر در انتهای بازوی بلند قرار دارد. از چهار جایگاه OPX2 دو جایگاه روی بازوی بلند و دو جایگاه دیگر روی بازوی کوتاه قرار دارد.

کروموزوم ۵ (I3-2-24): این کروموزوم ساب متاسانتريک با طول ۴/۴ میکرومیلیمتر، بزرگترین کروموزوم گونه *B. procumbens* می باشد. این کروموزوم دارای دو فرورفتگی در بازوی کوتاه و دیگری در بازوی بلند می باشد. دارای چهار جایگاه متمرکز PB6-4 در ناحیه سانترومر و دو جایگاه دیگر در بازوی بلند نزدیک به فرورفتگی می باشد، در حالی که دو جایگاه OPX2 در ناحیه میانی بازوی بلند قرار دارد. حداکثر تعداد علائم PB6-4 و OPX2 در سلول های انترفاز به ترتیب هشت و سه علامت بود.

کروموزوم ۶ (D2-2-27): این کروموزوم ساب متاسانتريک، کوچکترین کروموزوم گونه *B. procumbens* بوده و طول آن معادل ۲/۸ میکرومیلیمتر است. این کروموزوم دارای دو زائده ایوکروماتینی در انتهای بازوی کوتاه می باشد. دارای شش جایگاه PB6-4 بطور متمرکز در ناحیه سانترومر و دو جایگاه دیگر در انتهای بازوی کوتاه می باشد. ضمناً دارای دو جایگاه OPX2 روی بازوی کوتاه نزدیک به سانترومر نیز می باشد. حداکثر تعداد علائم PB6-4 و OPX2 در سلول های انترفاز به ترتیب ده و چهار علامت می باشد.

کروموزوم ۷ (AU6-1-4): طول این کروموزوم ساب متاسانتريک ۳/۳ میکرومیلیمتر است و دارای چهار جایگاه PB6-4 بطور فشرده در ناحیه سانترومر و دو جایگاه OPX2 روی بازوی کوتاه و نزدیک به جایگاه های PB6-4 می باشد. حداکثر تعداد جایگاه های PB6-4 و OPX2 در سلول های انترفاز به ترتیب دوازده و چهار علامت

می باشد.

کروموزوم ۸ (D3-2-13): طول این کروموزوم متاسانتريک ۴/۲ میکرومیلیمتر و سومین کروموزوم بزرگ در کاریوتایپ این گونه وحشی می باشد. دارای شش جایگاه PB6-4 در ناحیه سانترومر، دو جایگاه دیگر در ناحیه میانی مربوط به یکی از بازوها و دو جایگاه OPX2 روی همین بازو نزدیک به ناحیه سانترومر می باشد. حداکثر تعداد جایگاه های PB6-4 و OPX2 در سلول های انترفاز به ترتیب ده و چهار علامت می باشد. کروموزوم ۹ (C6-1-3): طول این کروموزوم ساب متاسانتريک ۳ میکرومیلیمتر است و دارای چهار جایگاه PB6-4 در ناحیه سانترومر می باشد. در کروموزوم های میتوزی جایگاه مشخصی برای OPX2 مشاهده نگردید. حداکثر تعداد جایگاه های PB6-4 و OPX2 در هسته های انترفاز به ترتیب هشت و شش علامت بود.

فیش (FISH) روی رشته های منبسط DNA

برای تخمین اندازه توالی های PB6-4 در هر یک از کروموزوم های *B. procumbens* از روش فیش (FISH) روی رشته های منبسط (مرحله انترفاز) DNA ی حاصل از گیاهان مونوسومیک با کروموزوم اضافی *B. procumbens* استفاده شد. نتیجه هیبرید PB6-4 (نشانه دار شده با Biotin) با رشته های منبسط DNA و تقویت^(۱) علائم پیوندی با استفاده از Goat Anti-avidin و Avidin-Texas Red متصل به Biotin ایجاد علائم خطی فلورسنت قرمز رنگ بود (عکس ۱E).

نتایج بدست آمده از اندازه گیری طول علائم خطی در هر یک از کروموزوم ها و شمارش تعداد نقطه های قرمز رنگ در هر یک از خطوط و نیز متوسط تعداد این نقطه ها در هر میکرومیلی متر در جدول شماره یک آمده است.

طول علائم خطی فلورسنت در هر یک از مونوسومیک ها متغیر بوده و از این نظر گروه های متفاوتی در هر یک از کروموزوم ها مشاهده می گردد. حداکثر و حداقل طول علائم خطی به ترتیب ۵۰ و ۵ میکرومیلی متر با میانگین ۲۲/۴۷ میکرومیلی متر می باشد. حداکثر و حداقل تعداد نقطه های قرمز در هر میکرومیلی متر از علائم خطی به ترتیب ۱/۵

۱- منظور تقویت ظاهری است تا پیوندها در زیر میکروسکوپ به خوبی دیده شود.

و ۰/۴ با میانگین ۰/۷۹ می باشد. باوجود این تغییرات همبستگی معنی داری بین طول علائم خطی و تعداد نقطه های موجود در هریک از این خطوط وجود دارد ($p=0/01$) و ($r=0/71$). در هریک از مونوسومیکها، علائم خطی با اندازه های مساوی یا تقریباً مساوی و تراکم مشابه از نظر تعداد نقطه های قرمز رنگ گروه بندی شدند (A-D). همان طوری که در جدول شماره یک نشان داده شده است در هریک از کروموزوم ها گروه های متمایزی مشاهده می گردد و نشان می دهد که تعداد کپی و محل قرار گرفتن PB6-4 در روی هر یک کروموزوم ها متفاوت می باشد.

بحث

با استفاده از این روش (FISH) پراکندگی و محل فیزیکی دو قطعه تکراری DNA خاص گروه *Procumbentes* بنامهای PB6-4 و OPX2 روی کروموزوم های گونه وحشی *B. procumbens* مشخص گردید. با استفاده از این روش که روی کروموزوم های میتوزی گونه *B. procumbens* در مرحله متافاز صورت گرفت مشخص گردید که محل قرار گرفتن پروب PB6-4 عمدتاً در ناحیه سانترومر تمام کروموزوم ها می باشد. ضمناً تعداد کپی و محل قرار گرفتن این پروب در هریک از کروموزوم ها نیز متفاوت می باشد. برخلاف PB6-4 پروب OPX2 عمدتاً در طول تمام کروموزوم ها پراکنده بوده، ضمناً تعداد کپی و محل قرار گرفتن آن نیز در هریک از کروموزوم های گونه *B. procumbens* متفاوت می باشد.

در بررسی های قبلی پراکندگی این قطعات تکراری روی تمام کروموزوم های گونه های *B. patellaris* و *B. procumbens* با استفاده از روشهای Squash-blot و انگشتنگاری DNA^(۱) به تایید رسیده است (۲۳ و ۲۴). هر دو پروب PB6-4 و OPX2 نیز برای تشخیص و تعیین خصوصیات هریک از کروموزوم های گونه های *B. procumbens* و *B. patellaris* موجود در مونوسومیک های حامل کروموزوم بیگانه مورد استفاده قرار گرفته است. بررسی های مولکولی انجام شده نشان داده است که پروب PB6-4 خود دارای چندین توالی تکراری DNA بنام Sat-121 می باشد و این توالی ها توسط قطعات

DNA ناشناخته‌ای از یکدیگر جدا شده‌اند (۲۸). ضمناً انگشت نگاری DNA با استفاده از Sat-121 و PB6-4 بطور جداگانه روی کروموزوم‌های گونه‌های گروه *Procumbentes* نتایج مشابهی داشته است که نشان دهنده وجود هومولوژی بین این دو پروپ می‌باشد (۲۴). Salentijn و همکارانش در سال ۱۹۹۴ گزارش نمودند که Sat-121 نزدیک به جایگاه ژنی Hsl که مقاومت به نماتد چغندر قند (*Heterodera schachtii* Schm) را کنترل می‌نماید، قرار گرفته است.

از مجموعه این نتایج می‌توان نتیجه‌گیری نمود که جایگاه ژنی مقاومت به نماتد همان طوری که قبلاً نیز پیش بینی شده بود (۳۲) نزدیک به سانترومر کروموزوم شماره ۱ قرار دارد.

قبلاً نیز جایگاه کروموزومی سه قطعه تکراری دیگر در ژنوم *B. procumbens* با استفاده از روش فیش مورد بررسی قرار گرفته است و مشخص شده است که این قطعات تکراری عمدتاً در ناحیه هتروکروماتین کروموزوم‌ها قرار دارند، از این سه قطعه تکراری DNA دو قطعه غیر همولوگ (غیر مشابه) Sau 3AI و Sau 3AII در ناحیه سانترومری هشت کروموزوم *B. procumbens* قرار دارند در حالی که قطعه تکراری سوم در تمام کروموزوم‌های این گونه پراکنده می‌باشد. هیبرید PB6-4 و OPX2 با کروموزوم‌های میتوزی گیاهان مونوسومیک اضافه با استفاده از تکنیک فیش نشان داد که این قطعات DNA تنها با یکی از کروموزوم‌های موجود در گیاهان ۱۹ کروموزومی پیوند برقرار می‌کنند. این نتیجه بیانگر آن است که این پروبها خاص گروه *Procumbentes* بوده و با کروموزوم‌های *B. vulgaris* هومولوژی ندارند که خود تاییدی است بر نتایج حاصل از آزمایشهای قبلی (۲۳) که با استفاده از روش Squash-blot انجام گرفته است. با توجه به اینکه روش GISH^(۱) در این بررسی مورد استفاده قرار نگرفت، اطمینانی بر عدم نو ترکیبی کروموزومی و کامل بودن کروموزوم‌های خارجی اضافه شده وجود ندارد، به هر حال عدم وجود علائم پیوندی روی کروموزوم‌های *B. vulgaris* و قبول این فرض که وقوع نو ترکیبی بدلیل عدم هومولوژی کروموزومی بسیار نادر می‌باشد (۲۱) می‌توان تصور نمود که بین کروموزوم‌های اضافه شده گونه وحشی و

کروموزوم‌های ژنوم *B. vulgaris* نوترکیبی صورت نگرفته است. پیوند این پروبها تنها با کروموزوم‌های اضافه شده این امکان را فراهم آورد تا بتوان ضمن تشخیص و شناسایی دقیق هریک از کروموزوم‌های *B. procumbens* از کروموزوم‌های *B. vulgaris* خصوصیات آنها را به کمک تفاوت در تعداد و محل قرار گرفتن علائم پیوند تعیین نمود. خصوصیات کروموزوم‌های منفرد گونه وحشی موجود در گیاهان مونوسومیک با مشخصات سه سری از کروموزوم‌های کامل گونه *B. procumbens* مورد مقایسه قرار گرفتند تا بتوان کاریوتیپ این گونه را تعیین نمود. نتایج این تحقیق نامگذاری جدید کروموزوم‌های گونه *B. procumbens* را که از طریق انگست نگاری DNA صورت گرفته بود (۲۴) مورد تایید قرار داد. در نامگذاری جدید، کروموزوم‌های قبلی ۶ و ۱ هر دو تحت کروموزوم ۱ و کروموزوم ۲-۲ (برای این کروموزوم قبلاً دو مرفوتایپ ۲-۱ و ۲-۲ تعیین شده بود) تحت عنوان کروموزوم شش نامگذاری شد. با استفاده از روش فیش نیز مشخص گردید که دو کروموزوم اضافی مونوسومیک‌های D1-2-13 و D3-2-35 که قبلاً تحت عنوان کروموزوم‌های ۶ و ۱ نامگذاری شده بودند دارای خصوصیات یکسانی هستند در حالیکه کروموزوم‌های دو مونوسومیک اضافی Au5-1-7 و D2-2-27 که تحت عنوان کروموزوم ۲-۱ و ۲-۲ نامگذاری شده بودند کاملاً از یکدیگر متمایز می‌باشند. در بررسی‌های قبلی مشخص شده است که در مقایسه با کروموزوم‌های فشرده، کوتاه و نسبتاً هم شکل مرحله متافاز، مرفولوژی کروموزوم‌ها در مرحله پاکیتن با داشتن نقاط هتروکروماتینی از یکدیگر متمایزتر می‌باشند (۳). میانگین طول کروموزوم‌های گونه *B. procumbens* در مرحله پاکیتن بین ۳۶/۶ تا ۱۹/۴ میکرومیلی متر متغیر بوده و شاخص سانترومری در کروموزوم‌های مختلف بین ۰/۴۲ تا ۰/۲۰ گزارش شده است، ضمناً ثابت شده است که طول و محل قرار گرفتن سانترومر یک کروموزوم در مرحله پاکیتن در نمونه‌های مختلف بدلیل تفاوت در انقباض قسمتهایی از کروموزوم بطور قابل توجهی متغیر می‌باشد. به هر حال کروموزوم‌های *B. procumbens* در مرحله پاکیتن برمبنای طول، محل قرار گرفتن سانترومر و الگوهای نواریندی از ۱ تا ۹ نامگذاری شده‌اند. در این بررسی نیز طول کروموزوم‌ها در مرحله متافاز بطور تقریب برآورد شد. اگر چه کروموزوم‌ها در این مرحله بسیار کوچک و منقبض بودند و برای هریک از کروموزوم‌ها تنها ۶ نمونه اندازه‌گیری شد با این وجود اطلاعات بدست آمده حاکی از آن است که

احتمالاً کروموزوم‌های ۱، ۵، ۶ و ۸ در مونوسومیک‌ها با کروموزوم اضافی به ترتیب منطبق است با کروموزوم ۲، ۳، ۹، ۱ مرحله پاکیتن که توسط DeJong (۱۹۸۱) توضیح داده شده است. همچنین می‌توان نتیجه‌گیری نمود که کروموزوم ۵ در مونوسومیک‌ها با کروموزوم اضافی با داشتن فرورفتگی ثانویه در انتهای بازوی کوتاه خود معادل کروموزوم ۳ در مرحله پاکیتن است که دارای ناحیه NOR (۲) می‌باشد.

روش جدیدی برای گستردن DNA در طول لام توسط Heng و همکارانش در سال ۱۹۹۲ بوجود آمده است که پس از اعمال روش فیش علائم خطی فلورسنت روی رشته‌های منبسط DNA ظاهر می‌گردد. با استفاده از این روش می‌توان ترتیب پروبهای مختلف را روی رشته‌های DNA مشاهده نمود و اندازه مولکولی آنها را تخمین زد. اگرچه این تکنیک عمدتاً در تحقیقات انسانی مورد استفاده قرار گرفته است (۳۴، ۱۰، ۱، ۱۳، ۵ و ۴۱) ولی اهمیت کار برد آن اخیراً در گیاهان *Arabidopsis* و گوجه‌فرنگی به اثبات رسیده است (۴۲ و ۴۳). در این تحقیقات نشان داده شده است که می‌توان نقشه پروبهای بدست آمده از کلونهای کاسمید، لامبدا و پلاسمید را که حاوی توالی‌های تکراری یا منفرد DNA هستند به آسانی روی رشته‌های منبسط DNA مشخص نمود.

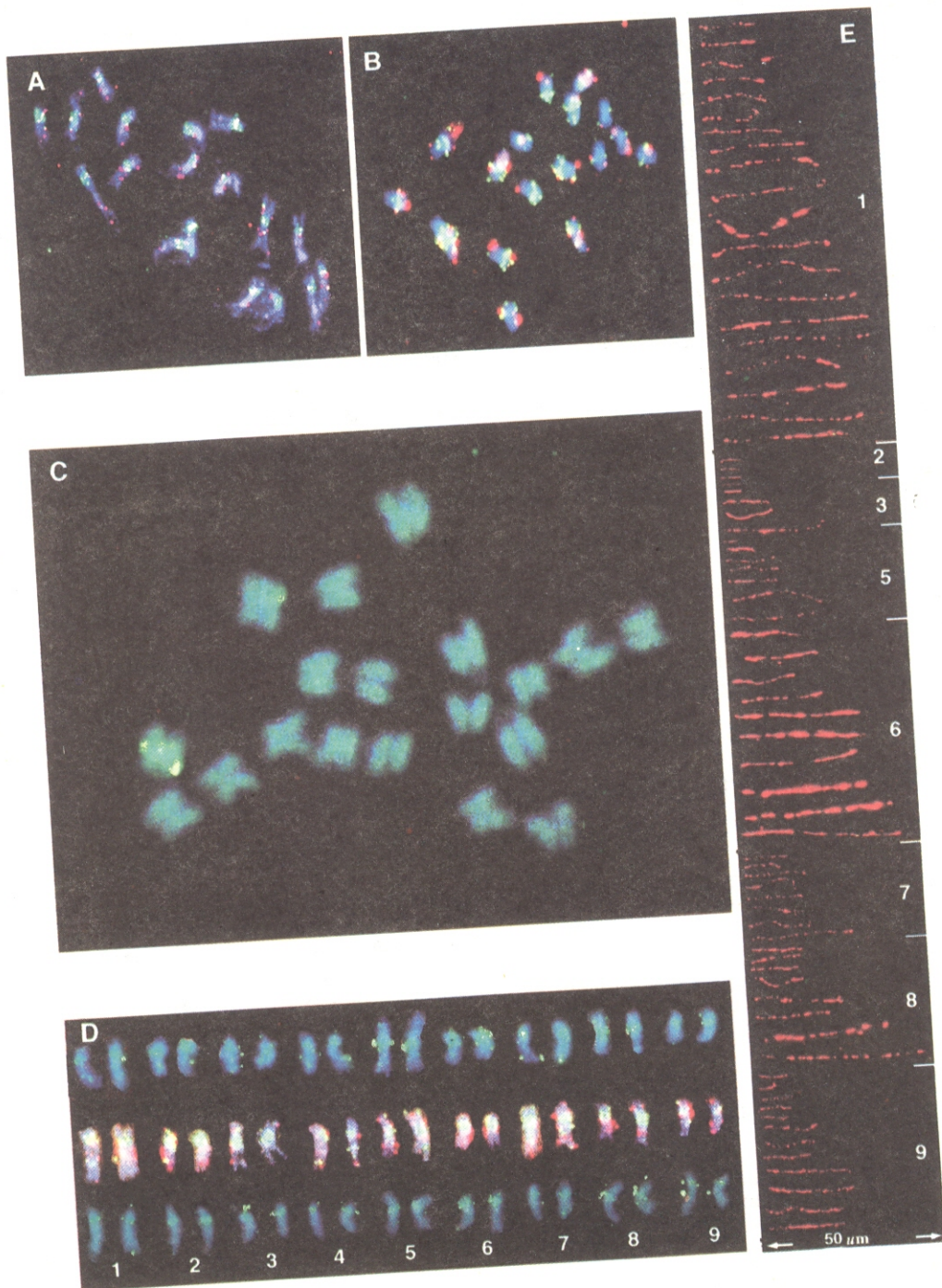
در این بررسی نیز نتیجه هیبرید پروب PB6-4 با رشته‌های منبسط DNA استخراج شده از گیاهان مختلف مونوسومیک اضافی *B. procumbens* تولید علائم خطی فلورسنت با طول‌های متفاوت بود. عکس‌العمل مونوسومیک‌ها از لحاظ ایجاد علائم فلورسنت خطی کاملاً متفاوت بود. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که هریک از کروموزوم‌های بیگانه تعداد متفاوتی از کپی‌های PB6-4 را دارا می‌باشند، ضمن اینکه الگوی پراکندگی و اندازه قطعاتی که پشت سر هم قرار گرفته‌اند نیز در هر کروموزوم متفاوت است. Frasz و همکارانش (۱۹۹۶) برآورد نموده‌اند که اندازه مولکولی هر میکرومیلیتر از رشته‌های منبسط DNA معادل ۲/۲۷ Kbp می‌باشد. اگر این برآورد در این تحقیق نیز مورد استفاده قرار گیرد می‌توان گفت که اندازه مولکولی گروه A، B، C، D در کروموزوم ۱ به ترتیب برابر است با ۵۷Kbp، ۸۲Kbp، ۱۲۰Kbp، ۱۴۰Kbp.

همان طوری که اشاره گردید پروب PB6-4 خود حاوی چندین کپی از Sat-121 می‌باشد، ضمناً مشخصات Sat-121 در گونه وحشی *B. procumbens* با استفاده از روش

(PFGE)^(۱) در گیاهان مربوط به فامیل AN1-89 که دارای ژنوم *B. vulgaris* و یک قطعه کوچک از کروموزوم ۱ گونه وحشی *B. procumbens* می باشد، مورد بررسی قرار گرفته است (۲۸). در این گیاهان Sat-121 در سه قطعه ۵۰ Kbp، ۱۰۰ Kbp، ۱۷۵ Kbp مشخص شده است. بنابراین می توان نتیجه گیری نمود که طول علائم خطی فلورسنت در گروه های A، C و D مربوط به کروموزوم ۱ با این قطعات برابر می باشد. گروه B در کروموزوم ۱ می تواند به گروه A تعلق داشته باشد و یا اینکه این قسمت در کروموزوم ۱ وجود دارد ولی در گیاهان فامیل AN1-89 قطعه اضافه شده حذف شده است. اطلاعات بدست آمده از این بررسی ثابت نمود که روش فیش روی رشته های منبسط DNA یک روش قابل اطمینان و سریع برای مشخص نمودن ترتیب قرار گرفتن پروب های مورد نظر و تخمین اندازه آنها در ژنوم گیاهی می باشد.

توضیح شکل (صفحه ۱۷)

شکل 1A و 1B. پیوند همزمان PB6-4 (علائم سبز) و OPX2 (علائم قرمز) با کروموزوم های *B. procumbens* در مرحله متافاز با استفاده از روش فیش شکل 1C. هیبرید پروپ PB6-4 (علائم سبز) با کروموزوم گیاهان مونوسومیک که حاوی کروموزوم شماره ۸ *B. procumbens* می باشند. شکل 1D. کاریو تیپ (کروموزوم های ۱ تا ۹) *B. procumbens* که با استفاده از روش فیش و هیبرید PB6-4 (علائم سبز) و یا OPX2 (علائم قرمز) با کروموزوم های *B. procumbens* و مونوسومیک های مربوطه و مقایسه آنها تعیین شده است. شکل 1E. هیبرید PB6-4 با رشته های منبسط DNA گیاهان مونوسومیک با کروموزوم اضافی *B. procumbens* با استفاده از روش فیش. علائم خطی فلورسنت با طول های متفاوت برای هریک از کروموزوم های اضافه بطور جداگانه نشان داده شده است.



جدول شماره ۱: نتیجه هیبرید پروب PB6-4 با رشته‌های منبسط DNA یک سری گیاهان مونوسومیک که شامل گیاهان دیپلوئید *B. vulgaris* با یک کروموزوم اضافی از گونه *B. procumbens* می‌باشند.

Table 1. FISH of PB6-4 on extended DNA fibres of a set of Beta procumbens derived monosomic additions in *B. vulgaris*

نوع کروموزوم اضافه شده Type of addition	شماره قابل Family Group Number of	تعداد مشاهدات Group Number of observations	طول به میکرومیلی متر Length in μm		تعداد نقطه‌ها Number of spots			
			دامنه تغییرات average range		دامنه تغییرات میانگین average range		در هر میکرومیلی متر per μm	
			میانگین average	دامنه تغییرات range	میانگین average	دامنه تغییرات range		
Chr. 1	D1-2-13	A	6	17.8	16-19	11.5	10-14	0.64
	D3-2-35	B	1	25.0		21.0		0.84
		C	7	37.0	32-42	20.1	17-24	0.54
		D	6	43.2	35-50	19.3	17-22	0.45
Chr.2	Au5-1-7	A	4	6.0	6-6	9.0	9-9	1.50
Chr.3	D3-2-17	A	1	6.0		7.0		1.17
		B	2	13.5	13-14	16.0	16-16	1.19
		C	1	27.0		24.0		0.89
Chr.4 missing								
Chr.5	I3-2-24	A	1	5.0		5.0		1.00
		B	1	8.0		12.0		1.50
		C	3	12.5	12-13	14.0	13-15	1.12
		D	2	23.7	22-25	22.0	21-23	0.93
Chr.6	D2-2-27	A	4	20.8	19-22	11.5	11-12	0.55
		B	5	31.7	31-32	15.4	14-17	0.48
		C	1	41.0		30.0		0.73
Chr.7	AU6-1-4	A	2	11.5	11-12	10.5	10-11	0.92
		B	5	19.2	19-20	14.4	12-20	0.75
		C	1	31.0		21.0		0.67
Chr.8	D3-2-13	A	4	16.1	16-17	9.7	9-12	0.60
		B	3	26.0	25-28	15.0	14-17	0.58
		C	1	47.0		24.0		0.51
Chr.9	C6-1-3	A	5	10.9	10-13	10.0	9-11	0.93
		B	3	15.0	15-15	18.0	17-19	1.20
		C	4	23.7	23-24	24.5	23-27	1.03

در هر یک از مونوسومیک‌ها، علائم با اندازه‌های مساوی یا تقریباً مساوی و تراکم مشابه از نظر تعداد نقطه‌های قرمز رنگ گروه‌بندی شده‌اند. (A-D)

- 1- Bengtsson U, Altherr MR, Wasmuth JJ & Winokur ST(1994). High resolution fluorescence in situ hybridisation to linearly extended DNA visually maps a tandem repeat associated with vacuolary muscular dystrophy immediately adjacent to the telomere of 4q. Human Molecular Genetics 3: 1801-1805.
- 2- Cai D, Kleine M, Kifle S, Harloff HJ, Sandal NN, Marcker KA, Klein-Lankhorst RM, Salentijn EMJ, Lange W, Stiekema WJ, Wyss U, Grundler FMW & Jung C(1997) Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugar beet. Science 275: 832-834.
- 3- De Jong JH(1981). Investigation into chromosome morphology of sugar beet and related wild species. PhD thesis, University of Amsterdam, The Netherlands, 58pp.
- 4- De Jong JH, Speckmann GJ, De Bock ThSM, Lange W & Van Voorst A (1986). Alien chromosome fragments conditioning resistance to beet cyst nematode in diploid descendants from monosomic additions of *B. procumbens* to *B. vulgaris*. Canadian Journal of Genetics and Cytology 28: 439-443.
- 5- Fidlerova H, Senger G, Kost M, Sanseau P & Sheer D (1994). Two simple procedures for releasing chromatin from routinely fixed cells for fluorescence in situ hybridisation. Cytogenetics and Cell Genetics 65: 203-205.
- 6- Fransz PF, Alonso-Blanco C, Liharska TB, Peeters AJM, Zabel P & De Jong JH (1996). High-resolution physical mapping in *Arabidopsis thaliana* and tomato by fluorescence in situ hybridisation to extended DNA fibres. The Plant Journal 9: 421-430.
- 7- Gall JG & Paradue ML (1969). Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparation. Proceedings of the National Academy

- of Science USA 63: 378-383.
- 8- Heijbroek W, Roelands AJ & De Jong JH (1983). Transfer of resistance to beet cyst nematode from *Beta patellaris* to sugar beet. *Euphytica* 32: 287-298.
- 9- Heijbroek W, Roelands AJ, De Jong JH, Van Hulst C, Schoone AHL & Munning RG (1988). Sugar beets homozygous for resistance to beet cyst nematode (*Heterodera schachtii* Schm.), developed from monosomic additions of *B. procumbens* to *B. vulgaris*. *Euphytica* 38:121-131.
- 10- Heiskanen M, Karhu R, Hellsten E, Peltonen L, Kallioniemi OP & Palotie A (1994). High resolution mapping using fluorescence in situ hybridisation to extended DNA fibers prepared from agarose-embedded cells. *Bio Techniques* 17: 928-933.
- 11- Heng HHQ, Squire J & Tsui LC(1992). High resolution mapping of mammalian genes by in situ hybridisation to free chromatin. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 89: 9509-9513.
- 12- Heslop-Harrison JS(1991). The molecular cytogenetics of plants. *Journal of Cell Sciences* 100: 15-22.
- 13- Heslop-Harrison JS & Schwarzacher T(1993). Molecular cytogenetics - biology and applications in plant breeding. *Chromosomes-today* 11: 191-198.
- 14- Houseal TW, Dackowski WR, Landes GM & Klinger KW (1994). High resolution mapping of overlapping cosmids by fluorescence in situ hybridisation. *Cytometry* 15: 193-198.
- 15- Jing J & Gill BS(1994). Nonisotopic in situ hybridisation and plant genome mapping: the first 10 years. *Genome* 37: 717-725.
- 16- Joos S, Fink TM, Ratsch A & Lichter P (1994). Mapping and chromosome analysis: the potential of fluorescence in situ hybridisation. *Journal of*

Biotechnology 35: 135-153.

- 17- Jung C & Wricke G (1987). Selection of diploid nematode-resistant sugar beet from monosomic addition lines. *Plant Breeding* 98: 205-214.
- 18- Jung C & Herrmann RG (1991). A DNA probe for rapid screening of sugar beet (*Beta Vulgaris* L.) carrying extra chromosomes from wild beets of the *Procumbentes* section. *Plant Breeding* 107: 275-279.
- 19- Klein-Lankhorst RM, Salentijn EMJ, Dirkse WG, Arens-de Ruyter M & Stiekema WJ (1994). Construction of a YAC library from a *Beta vulgaris* fragment addition and isolation of a major satellite DNA cluster linked to the beet cyst nematode resistance locus *Hs.pat-1*. *Theoretical and Applied Genetics* 89: 426-434.
- 20- Kleine M, Cai D, Elbl C, Herrmann RG & Jung C (1995). Physical mapping and coning of translocation in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) carrying a gene for nematode (*Heterodera schachtii*) resistance from *B. procumbens*. *Theoretical and Applied Genetics* 90: 399-406.
- 21- Lange W, De Bock ThSM, Van Geyt JPC & M (1989). Monosomic additions in beet (*Beta vulgaris*) carrying extra chromosomes of *B. procumbens*. *Theoretical and Applied Genetics* 76: 656-664.
- 22- Lange W, Jung C & Heijbroek W (1990). Transfer of beet cyst nematode resistance from *Beta* species of the section *Patellares* to cultivated beet. *Proceedings of the 53th IIRB Congress, Brussels*, PP. 89-102.
- 23- Langer-Safer PR, Levine M & Ward DC (1982). Immunological method for mapping genes on *Drosophila* polytene chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 79: 4381-4385.
- 24- Mesbah M, De Bock ThSM, Sandbrink JM, Klein-Lankhorst RM & Lange W (1996). Selection of monosomic addition plants in offspring families using repetitive DNA probes in *Beta* L. *Theoretical and Applied Genetics* 92: