

Barbara Rudolph

**Entwicklung, Charakterisierung
und genetische Kartierung
von Mikrosatelliten-Markern beim Raps
(*Brassica napus* L.)**



Cuvillier Verlag Göttingen

**Entwicklung, Charakterisierung und genetische Kartierung
von Mikrosatelliten-Markern beim Raps (*Brassica napus* L.)**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematischen-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Barbara Rudolph
aus Hamburg-Harburg

Göttingen 2001

D 7

Referent: Prof. Dr. H. W. Heldt

Korreferent: Prof. Dr. R. Tischner

Tag der mündlichen Prüfung: 27.06.2001

Für meine Eltern und für Lutz

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V	
Abbildungen	VIII	
Tabellen	IX	
1	Einleitung	1
1.1	Molekulare Marker	1
1.2	Was sind „Mikrosatelliten“?	5
1.3	Mikrosatelliten als molekulare Marker	11
1.4	Ziele dieser Arbeit	13
2	Material und Methoden	16
2.1	Material	16
2.1.1	Chemikalien und Enzyme	16
2.1.2	Behandlung von Geräten und Lösungen	16
2.1.3	Oligonukleotide	16
2.1.4	DNA-Längenmarker	18
2.1.5	Bakterienstämme und Vektoren	19
2.1.6	Bakteriennährmedien und -anzucht	19
2.1.7	Erstellung der Bakterien-Stammkulturen	20
2.1.8	Antibiotika	21
2.1.9	Pflanzenmaterial	21
2.2	Molekularbiologische Methoden	23
2.2.1	Übersicht über die Methodik zur Identifizierung, Charakterisierung und Kartierung von Mikrosatelliten-Markern	23
2.2.2	Durchsuchen der genomischen DNA-Phagen-Bank	25
2.2.2.1	1. Screenen der DNA-Phagen-Banken	25
2.2.2.1.1	Herstellung der Phagenplatten	26
2.2.2.1.2	Herstellung der Phagenmembranen	27
2.2.2.1.3	Herstellung radioaktiv markierter Sonden	27
2.2.2.1.4	Hybridisierung der Membranen	28
2.2.2.1.5	„Strippen“ der Membranen	30

II

2.2.3	2. Screenen der DNA-Phagen-Banken	30
2.2.4	3. Screenen der DNA-Phagen-Banken	31
2.2.4.1	Umwandlung der Phagen in Bakterienklone durch „ <i>in vivo</i> excision“	31
2.2.4.2	Herstellung der Hybridisieremembranen	32
2.2.4.3	Hybridisierung der Bakterienmembranen	33
2.2.5	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	33
2.2.5.1	Verkürzte Mini-Plasmid-Präparation nach BIRNBOIM und DOLY (1979)	34
2.2.5.2	Minipräparation von Plasmid-DNA durch Affinitäts-Chromatographie	35
2.2.6	Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen	35
2.2.7	DNA-Sequenzierung nach SANGER et al. (1977)	36
2.2.7.1	T7-Sequenzierungs-Reaktion	36
2.2.7.2	„Cycle-Sequencing“-Reaktion	38
2.2.7.3	Sequenzierungsgel	39
2.2.8	Primerdesign mittels „Oligo® Primer Analysis Software Version 6 für Macintosh“	41
2.2.8.1	Design der „Ankerprimer“ mittels „Oligo® Primer Analysis Software Version 6 für Macintosh“	43
2.2.9	Isolierung von Raps-Gesamt-DNA	44
2.2.10	Gesamt-DNA-Konzentrationsbestimmung	46
2.2.11	Herstellung und Verwendung der internen Standards	47
2.2.11.1	PCR zur Herstellung der internen Standards	47
2.2.11.2	Zusammenstellung der internen Standards	49
2.2.12	PCR-Analysen der Mikrosatelliten-Primerpaare	50
2.2.13	Auftrennung der PCR-Produkte	52
2.2.13.1	Auftrennung der PCR-Produkte mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese	52
2.2.13.2	Auftrennung der PCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese	53
2.2.13.3	Ethidiumbromid-Färbung und Dokumentation von Agarosegelen	54
2.2.14	Datenanalyse	55
2.2.14.1	Auswertung der Sequenz-Reaktionen mittels ALFexpress™	55
2.2.14.2	Auswertung der Muster der PCR-Amplifikationsprodukte nach der Gelelektrophorese	56
2.2.14.3	Ermittlung genetischer Distanzen	56
2.2.14.4	Genetische Kartierung	57

3	Ergebnisse	59
3.1	Isolation der Mikrosatelliten aus genomischen Raps-DNA-Phagen-Banken	59
3.2	Identifizierung der Mikrosatelliten	61
3.3	Charakterisierung der identifizierten Mikrosatelliten	62
3.4	Primerdesign an den flankierenden Mikrosatelliten-Regionen	67
3.5	Prüfung der Mikrosatelliten-Primerpaare und Optimierung der Amplifikationsbedingungen	70
3.6	Analyse der Mikrosatelliten-Primerpaare im Raps	72
3.6.1	Verhalten der Loci im Raps	72
3.6.2	Verhalten der SSR-Primerpaare im Raps	74
3.6.3	Analyse der „Ankerprimer“ im Raps (<i>Brassica napus</i> L.)	81
3.7	Charakterisierung der Mikrosatelliten-Primerpaare in den verschiedenen <i>Brassica</i> -Arten	82
3.7.1	Verhalten der Loci in den untersuchten <i>Brassica</i> -Arten	83
3.7.2	Bestimmung der genetischen Distanzen	88
3.8	„Multiplexing“ und „Multiloading“ der Mikrosatelliten-Primerpaare	90
3.9	Darstellung der SSR-Produkte im Agarose-Gel	93
3.10	Kartierung der Mikrosatelliten-Marker in der DH-Population von ‚Mansholt‘ und ‚Samourai‘	97
4	Diskussion	103
4.1	Häufigkeit der Mikrosatelliten-Motive GA und CA im Rapsgenom	103
4.2	Technische Entwicklung von Mikrosatelliten-Markern	104
4.3	Analyse der Mikrosatelliten in Bezug auf ihre Nutzung als molekulare Marker	107
4.4	Alternative Methoden zur Identifizierung von Mikrosatelliten	110
4.5	Optimierung der Mikrosatelliten-Analyse für die Massenproduktion	112
4.6	Zuordnung der Amplifikationsprodukte zu genetischen Loci	115
4.7	Sortenübergreifende Analyse anhand der Mikrosatelliten-Marker	119
4.8	Verwendung der Mikrosatelliten-Marker für artenübergreifende Analysen	122

4.9	Kartierung der Mikrosatelliten-Marker in der RFLP-Kopplungs- karte von ‚Mansholt‘ und ‚Samurai‘	124
4.10	Anwendung der SSR-Marker in der Pflanzenzüchtung	126
4.11	Ausblick	128
5	Zusammenfassung	130
6	Literatur	132
7	Anhang	153
7.1	Anhang A: Verwendete Chemikalien und Enzyme	153
7.2	Anhang B: Liste der untersuchten <i>Brassica</i>-Genotypen	154
7.3	Anhang C: Übersicht über alle identifizierten SSR-Klone	156
7.4	Anhang D: Allele der mit SSR-Primerpaaren amplifizierten Loci	164

Abkürzungsverzeichnis

Ø	Durchschnitt
°C	Grad Celsius
A	Adenin
Abb.	Abbildung
AFLP	„amplified fragment length polymorphism“
Amp	Ampaire
APS	Ammoniumperoxydisulfat
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
c	zenti-
CAT	Chloramphenicol Acetyltransferase
ca.	circa
cm	Zentimeter
cM	centi Morgan
cp	Chloroplast
CTAB	Hexadecyl-Trimethyl-Ammoniumbromid
Cy5	ein Indodicarbocyanin-Fluorochrom
dest.	destilliert
DAMD	„direct amplification of minisatellite DNA“
d. h.	das heißt
DH	doppelt haploid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dCTP	Desoxycytosin-5´-Triphosphat
dNTP	Desoxynukleotid-5´-Triphosphat
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alteri (und andere)
evtl.	eventuell
F ₁	1. Tochtergeneration
F ₂	2. Tochtergeneration
g	Gramm
G	Guanin
G/C-Gehalt	Gehalt an Guanin und Cytosin
GD	genetische Distanzen
h	Stunde(n)
HGP	„human genome project“
HCl	Salzsäure
ISSR	„inter simple sequence repeats“
k	kilo-
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasenpaare
kcal/ mol	Kilokalorien pro Mol
l	Liter

M	Mol pro Liter, molar
m	Meter
mA	Milliampaire
mm	Millimeter
mon.	monomorph
MAS	„marker-assisted selection“
MCS	„multi cloning site“
mg	Milligramm
ml	Milliliter
μ	mikro-
min	Minute
(X) _n	unbestimmt viele
n	Nano-/ Anzahl
OD	optische Dichte
p	Pico-
Pa	Pascal
PCR	„polymerase chain reaction“
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
pol.	polymorph
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RAMP	„random amplified microsatellite polymorphic fragments“
RAPD	„random amplified polymorphic DNA“
RFLP	„restriction fragment length-polymorphism“
RNase	Ribonuklease
rpm	„rounds per minute“
RT	Raumtemperatur
s. o.	siehe oben
SCAR	„sequence characterized amplified regions“
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SNP	„single nucleotide polymorphisms“
sog.	sogenannt
sp.	Spezies
SR	Sommerraps
SSC	Saline Sodiumcitrat
SSLP	„simple sequence length polymorphisms“
SSM	„slipped-strand misparing“
SSR	„simple sequence repeat“
ssp.	Subspezies
STR	„Short tandem repeats“
STS	„sequence tagged sites“
syn.	synonym
T	Thymin
Ta	Annealingtemperatur
Tab.	Tabelle
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylendiamin

TM	Trademark
T _m	mittlere Schmelztemperatur
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
u. a.	unter anderem
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
ÜN	über Nacht
UV	ultraviolett
V	Volt
VNTR	„varial numbers of tandem repeats“
v/v	Volumen pro Volumen
W	Watt
w/v	Gewicht pro Volumen
WR	Winterraps
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

Abbildungen

Abb. 1.1:	Entstehung von „Versetzung-Fehlpaarungen“ bei der DNA-Replikation, Schema aus MOXON und WILLS 1999.	10
Abb. 2.1:	Schema der Herstellung der doppelt haploiden Kartierungspopulation (nach UZUNOVA 1994).	22
Abb. 2.2:	Übersicht über die Schritte zur Identifizierung, Charakterisierung und Kartierung von Mikrosatelliten-Markern beim Raps (<i>Brassica napus</i> L.).	24
Abb. 3.1:	Beispiele aus der ersten bis dritten Hybridisierung.	60
Abb. 3.2:	Beispiele für verschiedene SSR-Typen.	64
Abb. 3.3:	Vergleich der Anzahl an Motiv-Wiederholungen und ihrer Häufigkeit.	66
Abb. 3.4:	Die Sequenz des Klonen MD92 mit dem Mikrosatelliten direkt vor der hinteren Restriktionsschnittstelle SAU3A I (GATC).	68
Abb. 3.5:	Fragmentanalysen der SSR-Primerpaare MR8.1 und MR8.2 sowie die dazugehörige DNA-Sequenz mit beiden Mikrosatelliten.	71
Abb. 3.6:	Ein Ausschnitt aus der Analyse von MR123 als Beispiel für das unterschiedliche Verhalten von SSRs im Sommer- und Winterraps.	79
Abb. 3.7:	Beispiel für den Nachweis der Herkunft des Locus MR157.2.	86
Abb. 3.8:	Dendrogramm der Distanzbeziehungen zwischen den 52 Brassicaceen-Genotypen, erstellt nach dem „average linkage“ Verfahren.	89
Abb. 3.9:	Beispiel zum „Multiloading“, hier mit den SSR-Primerpaaren MR104 und MR115.	91
Abb. 3.10:	Beispiel zum „Multiplexing“ mit den SSR-Primerpaaren MR163.1 und MR231.	93
Abb. 3.11:	Auftrennung der SSR-Produkte des Mikrosatelliten MR228 mit den ersten 28 Linien des Raps-Sortiments.	94
Abb. 3.12:	Auftrennung der SSR-Produkte des Mikrosatelliten MR155 mit den ersten 28 Linien des Raps-Sortiments.	96
Abb. 3.13:	RFLP/SSR-Kopplungskarte des Rapsgenoms.	99

Tabellen

Tab. 1.1:	Übersicht über die Einteilung der SSRs in Typen.	7
Tab. 1.2:	Pflanzen, in denen SSRs identifiziert wurden.	12
Tab. 2.1:	Verwendete Oligonukleotide.	17
Tab. 2.2:	Für die Selektion verwendete Antibiotika.	21
Tab. 2.3:	Verwendete genomische DNA-Phagen-Banken.	25
Tab. 2.4:	Primerkombinationen zur Herstellung definierter PCR-Produkte.	48
Tab. 2.5:	Zusammensetzung der internen Standards für PCR-Analysen.	49
Tab. 3.1:	Übersicht über die dreifache Hybridisierung der genomischen DNA-Phagen-Banken mit poly-GA- und poly-CA-Sonden.	61
Tab. 3.2:	Zusammenfassung der Sequenzierung positiver SSR-Klone.	61
Tab. 3.3:	Übersicht über die Anzahl der identifizierten Mikrosatelliten.	62
Tab. 3.4:	Übersicht über die Charakterisierung der Mikrosatelliten-Typen.	63
Tab. 3.5:	Übersicht über Art und Anzahl der SSR-Motive.	65
Tab. 3.6:	Übersicht über die Verwendbarkeit der SSRs zum Primerdesign.	67
Tab. 3.7:	Beispiele des Designs von „Ankerprimern“.	69
Tab. 3.8:	Übersicht über die 199 Loci aus den 113 SSR-Primerpaaren.	72
Tab. 3.9:	Übersicht über das Verhalten der Loci in den 38 Raps-Linien.	73
Tab. 3.10:	Anzahl Allele der polymorphen SSR-Loci in den 38 Raps-Linien.	74
Tab. 3.11:	Analyse der 113 SSR-Primerpaare in den 38 Raps-Linien.	75
Tab. 3.12:	Aufteilung der untersuchten Mikrosatelliten-Primerpaare anhand des zugehörigen SSR-Typus.	75
Tab. 3.13:	Aufteilung der SSR-Primerpaare anhand des Typus des zugehörigen Mikrosatelliten und dessen Verhalten in den 38 Raps-Linien.	76
Tab. 3.14:	Aufteilung der SSR-Motive und deren Verhalten in den 38 Raps-Linien.	77
Tab. 3.15:	Aufteilung der SSR-Größen und deren Verhalten in den 38 Raps-Linien.	78
Tab. 3.16:	SSR-Loci, die Unterschiede in ihrem Verhalten im Sommerraps (SR) und im Winterraps (WR) aufweisen.	80
Tab. 3.17:	Anwendbarkeit und Verhalten der „Ankerprimer“ im Raps.	82
Tab. 3.18:	Loci, die in den <i>Brassica</i> -Arten, aber nicht in <i>Brassica napus</i> vorkommen.	83

Tab. 3.19: Übersicht über die Loci in den untersuchten <i>Brassica</i> -Arten.	84
Tab. 3.20: Polymorphiegrad der Loci in den untersuchten <i>Brassica</i> -Arten.	84
Tab. 3.21: Liste der Loci, deren Herkunft aus dem A- bzw. C-Genom nachweisbar war.	87
Tab. 3.22: Fragmentgrößen des SSR-Markers MR228.	95
Tab. 3.23: Fragmentgrößen des SSR-Markers MR155.	96
Tab. 3.24: Kartierte SSR-Marker und ihre Zuordnung zu den Kopplungsgruppen.	98

1 Einleitung

1.1 Molekulare Marker

In der Pflanzenzüchtung wurden und werden morphologische Merkmale als Marker zur Selektion von Populationen mit züchterisch wertvollen Eigenschaften verwendet. Der Nachteil morphologischer Merkmale ist jedoch, daß diese Marker in vielen Pflanzenarten nur in einer begrenzten Zahl vorhanden sind. Außerdem sind viele dieser Marker erst im adulten Zustand erkennbar und damit für Bonitierungen geeignet, wodurch die Züchtung einer Sorte sehr zeitaufwendig ist. In den vierziger Jahren wurden unter großem experimentellen Aufwand morphologische Genkarten bei Pflanzen konstruiert. Beispiele sind die Genkarten von Tomate (MACARTHUR 1934) und Mais (EMERSON et al. 1935).

Um die Selektionszeit zu verkürzen, wurden 1980 von TANKSLEY und RICK erstmals molekulare Marker in eine Kopplungskarte integriert. Bei diesen ersten molekularen Markern handelte es sich um Isoenzyme. Der Vorteil in der Verwendung von Isoenzymen als Marker war zunächst der, daß diese schon sehr früh, d. h. im Keimlingsstadium erkennbar waren. Außerdem handelte es sich um codominante Marker, was den Vererbungsvorgang der gesuchten Gene leichter nachweisbar machte. Nachteilig war hier nur, daß wenig bekannte Isoenzyme vorhanden waren, wodurch diese nur geringe Anwendungsmöglichkeiten in der Züchtung boten (TANKSLEY 1983). Außerdem werden die meisten Merkmale, die agronomisch von Interesse sind, durch mehrere Gene reguliert, sie sind also polygen und zeigen komplexe Vererbungen auf, was mehr Anforderungen an eine markergestützte Selektion erfordert (RIBAUT und HOISINGTON 1998).

Auf DNA-Ebene boten die von BOTSTEIN et al. 1980 entwickelten sog. Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen (RFLPs) viel mehr Einsatzmöglichkeiten innerhalb der Pflanzenzüchtung. Dabei wird DNA verdaut und auf einem Agarosegel aufgetrennt. Durch Hybridisierung mit beliebigen, markierten DNA-Sonden werden Unterschiede im

Bandenmuster sichtbar gemacht. Diese Polymorphismen sind durch Punktmutationen, Inversionen, Insertionen und/ oder Deletionen entstanden.

RFLP-Marker erbrachten eine Vielzahl von Vorteilen: Es handelt sich hier um in der Regel codominante Marker, die multiple Allelien nachweisen können. Sie sind unabhängig von der Entwicklungsphysiologie und von Umweltfaktoren sowie phänotypisch neutral. Außerdem steht mit den RFLP-Markern eine unter praktischen Gesichtspunkten unbegrenzte Anzahl von Markern zur Verfügung.

Diese molekularen Marker fanden bisher zahlreiche Anwendung in der Züchtung wie z. B. bei der Sortenidentifizierung, der Berechnung genetischer Distanzen und der markergestützten Einkreuzung erwünschter Eigenschaften in Zuchtlinien wie z. B. das Einkreuzen von Wildtyp-Merkmalen in Zuchtlinien (TANKSLEY und MCCOUCH 1997). RFLP-Marker werden außerdem zum Pyramidisieren von Genen (HUANG et al. 1997), zur Überprüfung des Erfolges bei Einkreuzungen oder bei der somatischen Zellfusion eingesetzt. Weiterhin werden diese DNA-Marker bei der markergestützten Selektion qualitativer und quantitativer Merkmale, der Klonierung von Genen und der vergleichenden Genomanalyse z. B. bei Tomate und Kartoffel (BONIERBALE et al. 1988) oder bei Hirse und Mais (WHITKUS et al. 1992) eingesetzt.

Für viele dieser Anwendungen werden Kopplungskarten benötigt: Ein Beispiel sei hier die markergestützte Rückkreuzung (YOUNG und TRANKSLEY 1989). Hierfür wurden wiederum zahlreiche Kopplungskarten für Pflanzen und Tiere angelegt. Die erste Raps-RFLP-Karte wurde 1991 von LANDRY et al. aus der F₂ einer Kreuzung von zwei Sommerrapsorten erstellt. Für den Winterraps wurde von UZUNOVA et al. (1995) eine Kopplungskarte aus einer DH-Population von den Sorten „Mansholt's Hamburger Raps“ und „Samourai“ zusammengestellt. Diese Karte wird in der vorliegenden Arbeit ebenfalls verwendet. Eine Übersicht über erste RFLP-Karten pflanzlicher Genome ist von UZUNOVA (1994) zusammengefaßt worden. Mit Hilfe von RFLP-Karten können unter anderem Genom-Vergleiche durchgeführt werden (BONIERBALE et al. 1988, WHITKUS et al. 1992, SONG et al. 1995).

Ein großer Nachteil der RFLP-Marker liegt jedoch darin, daß sie für Massenanalysen an Pflanzen nicht geeignet sind, weil die Nachweismethode sehr aufwendig ist. Sie

erfordern zudem größere Mengen an DNA (im µg-Bereich). Auf Polymerase-Ketten-Reaktionen (PCR) (SAIKI et al.1985, MULLIS und FALOONA 1987, SAIKI et al.1988) gestützte Nachweismethoden benötigen dagegen weitaus geringere Mengen an DNA. Mit Hilfe dieser Methoden können aus lediglich 20 bis 30 ng DNA gezielt polymorphe Loci vervielfältigt – also amplifiziert – werden. Dadurch wird es möglich, in sehr frühen Stadien Analysen durchzuführen, weil hier nur wenig Zellmaterial benötigt wird. Ein weiterer Vorteil liegt darin, daß schnelle DNA-Isolierungsmethoden gewählt werden können, gerade weil so wenig DNA für eine PCR benötigt wird. Wegen der hohen Effizienz der PCR-Technologie und Automatisierungsmöglichkeit der Analysen ist ein hoher Durchsatz an Proben möglich (KRESOVICH et al. 1995, POWELL et al. 1996, RIBAUTL et al. 1997, RIBAUTL und HOISINGTON 1998).

Auf PCR-Reaktion basierende Marker können in verschiedenen Varianten genutzt werden, die hier nur noch kurz erläutert werden sollen: Zu den PCR-Markern gehören in erster Linie die „random amplified polymorphic DNA“ (RAPD), die von WILLIAMS et al. 1990 entwickelt wurde. Dabei wird eine Auswahl willkürlicher, kurzer Primer (8 - 10 bp) verwendet, mit deren Hilfe zufällige Loci im Genom vervielfältigt und anschließend auf einem Agarosegel aufgetrennt werden. An diesen Loci entstandene Veränderungen im Genom werden durch das Auftreten unterschiedlicher DNA-Amplifikationsprodukte sichtbar. Diese Methode ist neben den oben aufgezählten Vorteilen zudem sehr einfach, schnell und kostengünstig und kann daher mit geringem Aufwand in jedem Labor ausgeführt werden. Es wurden unter anderem genetische Verwandtschaften mittels RAPD-Marker untersucht, so im Mais (WELSH et al. 1991) und der Ackerbohne (LINK et al. 1995), aber auch beim Raps (FÖRSTER und KNAAK 1995).

Mit Hilfe der RAPD-Marker können jedoch nur dominante Erbvorgänge nachgewiesen werden. Außerdem erwiesen sich die RAPD-Analysen oftmals als nicht reproduzierbar und weniger zuverlässig. Aus diesem Grund werden heute immer mehr RAPD-Marker in sog. „sequence characterized amplified regions“ (SCAR-Marker, PARAN und MICHELMORE 1993) umgeformt. Hierfür wird der Locus, der durch den RAPD-Marker amplifiziert wurde, sequenziert und für die Enden dieses DNA-Fragments längere, spezifische Primer synthetisiert. Diese SCAR-Marker erwiesen sich als reproduzierbarer und zuverlässiger als RAPD-Marker, aber genauso zeit- und

kostengünstig wie die RAPD-Marker, aus denen sie entstanden sind. Sie wurden z. B. für Massenanalysen in der markergestützten Selektion (marker-assisted selection = MAS) der Resistenz gegen Mehltau bei Weizen erfolgreich eingesetzt (LIU et al. 1999).

Ein weiterer PCR-Markertyp, der vielfach eingesetzt wird, ist der 1993 von ZABEAU und VOS patentierte „amplified fragment length polymorphism“ (AFLP), dessen Methode 1995 von VOS et al. ausführlich beschrieben wurde. Es handelt sich hier um eine Kombination aus Restriktions- und PCR-Methoden: Nach einer Restriktion der genomischen DNA werden an die Enden der Fragmente Adapter ligiert. Diese Fragmente werden als Template-DNA für eine PCR mit bestimmten Primern verwendet. Diese Primer besitzen die Sequenz der Adapter und der Restriktionschnittstelle. Durch zusätzliche selektive Basen wird die Spezifität des Primer-„Annealens“ bestimmt. Hier können mit wenigen Primern eine Vielzahl von Loci untersucht werden. Dieses bringt jedoch den Nachteil, daß die Auswertung der Analysen durch eine Vielzahl von Banden in Polyacrylamid-Gelen kompliziert ist. Außerdem ist diese Methode wieder zeitaufwendiger durch vorgeschaltete Restriktions-, sowie Ligations- und PCR-Reaktionen.

Weitere PCR-Marker setzen eine Kenntnis der zu untersuchenden DNA-Sequenz voraus, weil hierbei Primer an genomspezifische Loci binden. Hierzu gehören Bereiche, die nur einmal im Genom vorkommen und bereits sequenziert wurden. Diese „sequence tagged sites“ (STS) (MULLIS und FALOONA 1987, OLSON et al. 1989) sind codominante Marker, die ca. 100 bis 1.000 bp groß sind. Sie dienen als Erkennungsstellen für bestimmte Genomabschnitte und werden daher bei der physikalischen Kartierung eingesetzt (OLSON et al. 1989). Sie haben besonders in dem „human genome project“ (HGP) zur Aufklärung des menschlichen Genoms immer mehr an Bedeutung gewonnen (COLLINS und GALAS 1993).

Darüber hinaus können alle Sequenzen direkt auf Punktmutationen und dadurch auftretende Polymorphismen, sog. „single nucleotide polymorphisms“ (SNPs) (Beispiele: KONFORTOV et al. 1999, MEKSEM et al. 2001) untersucht werden. Für schnelle Massenanalysen sind allerdings automatische Sequenzierungen und

aufwendige Alignment-Software erforderlich, um diese Mutationen erkennen zu können.

Bei den sog. „direct amplifications of minisatellite DNA by PCR“ (DAMD-PCR-Markern) (SOMERS et al. 1996) dienen Minisatelliten als Grundlage für spezifische Primer. Dadurch werden aufwendige Hybridisierungsarbeiten in einfache PCR-Reaktionen umgewandelt.

Zuletzt soll hier die große Gruppe der Mikrosatelliten-Marker genannt werden, deren Identifizierung und Entwicklung aufgrund seiner vielseitigen Einsetzbarkeit immer weiter steigen.

1.2 Was sind „Mikrosatelliten“?

Genomische DNA erzeugt nach einer Zentrifugation im Cäsiumchlorid-Gradienten und Ethidiumbromid-Färbung (MESELSON et al. 1957) charakteristische, artspezifische Banden. Neben einer Hauptbande an genomischer DNA werden eine oder mehrere Nebenbanden sichtbar. Diese wurden 1962 von KIT als Begleit- oder Satelliten-DNA bezeichnet. Diese DNA war im wesentlichen auf die Centromere (HARRISON und HESLOP-HARRISON 1995) und Telomere (WESTMAN und KRESOVICH 1997) der Chromosomen begrenzt und bestand aus langen, sich tandemartig wiederholenden Sequenzbereichen, also repetitive DNA mit einem hohen Anteil an Guanin und Cytosin (G/C-Gehalt). Satelliten-DNA wurde aber auch in Chloroplasten (EDELMAN et al. 1965, RAY und HANAWALD 1965) und Mitochondrien (RABINOWITZ et al. 1965, CORNEO et al. 1966) gefunden, die ebenfalls einen hohen G/C-Gehalt in ihrer DNA aufwiesen. Die spätere Definition von Satelliten-DNA beschränkte sich auf diese langen, sich wiederholenden Sequenzen, egal ob diese nun in einem Dichtegradienten Satelliten-Banden bildeten oder nicht.

Durch Zufall wurden von BELL et al. 1982 durch Sequenzierungsarbeiten an menschlichen Insulingenen kurze DNA-Sequenzen entdeckt, die sich ebenfalls tandemartig wiederholten, die aber nur Größen von 15 Basenpaaren (bp) aufwiesen. Diese Core-Einheiten, sog. „Repeats“, die bis zu 100 bp lang sein konnten und

ca. 10- bis 100fach wiederholt werden, wurden 1985 von JEFFREYS et al. in der Klasse der Minisatelliten zusammengefaßt. Sie sind z.T. im Genom verstreut, kommen jedoch im telomeren (ROYLE et al. 1987, NAKAMURA et al. 1988) und subtelomeren Bereich (SIMMLER et al. 1987) gehäuft vor. Sie weisen Polymorphismen in ihren Längen auf, sog. „varial numbers of tandem repeats (VNTRs), die von Individuum zu Individuum variieren können und sich nach den Mendelschen Regeln vererben (JEFFREYS et al. 1985). Hieraus wurde von JEFFREYS und Mitarbeitern 1985 das genetische Fingerprinting entwickelt, bei der genomische DNA restringiert, gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf Membranen fixiert und mit Minisatelliten-Sonden hybridisiert (SOUTHERN 1975) wird. Mit den daraus resultierenden individuell unterschiedlichen Bandenmustern ließen sich Verwandtschaftsbeziehungen nachweisen (JEFFREYS et al. 1985).

Etwa zeitgleich fanden MIESFELD et al. (1981) in der menschlichen Intergen-Region des δ - und β -Globins eine aus den Basen Guanin (G) und Thymin (T) bestehende „Core“-Einheit, die sich 17fach wiederholte (GT)₁₇. Kurz darauf wurden weitere kleinere bp-Motive entdeckt, die sich tandemartig wiederholten (u. a. HAMADA und KAKUNAGA 1982, TAUTZ und RENZ 1984, GROSS und GARRARD 1986, PARDUE et al. 1987 und BRAATEN et al. 1988). WEBER und MAY sowie LITT und LUTY nannten 1989 diese DNA-Sequenzen Mikrosatelliten. Sie sind auch unter „short tandem repeats“ (STRs) (WANG et al. 1994, SPRECHER et al. 1996) oder „simple sequence repeats“ (SSRs) (JACOB et al. 1991) bekannt. In der vorliegenden Arbeit werden im folgenden die Begriffe Mikrosatelliten und SSRs verwendet.

Die Definition der Mikrosatelliten ist bis heute noch umstritten: TAUTZ sprach 1989 von einer „Core“-Einheit aus Mono-, Di- oder Trinukleotiden, die wiederholt werden, wobei auch größere Motive eine Einheit bilden können. SPRECHER et al. (1996) definierten diese „Core“-Einheiten mit Größen von 3 bis 7 bp. LAVI et al. (1994) berichteten von Einheiten bestehend aus 2 bis 5 bp, und KOSTIA et al. schrieben 1995 von 2 bis 4 bp-Motiven. AYRES SIA et al. (1997) grenzen SSRs mit 1 bis 13 bp-Motiven gegen die Minisatelliten ab. Allgemein wird jedoch in der Literatur von 1 bis 6 bp gesprochen (Beispiele: WANG et al. 1994, MÖRCHEN et al. 1996, VAN DE VEN und MCNICOL 1996). Diese Einheit wurde auch für diese Arbeit als Grundlage gewählt. Auch die Anzahl an Wiederholungen ist nicht fest beschrieben. VAN DE VEN

und MCNICOL (1996) sprechen von mehr als 10 Wiederholungen. WEBER legte 1990 die Faustregel von ebenfalls mindestens 10 Wiederholungen bei Dinucleotiden fest, bei dem ein Polymorphismus entstehen kann. Spätere Untersuchungen zeigten, daß auch kürzere Mikrosatelliten durchaus polymorph sein können (SENIOR und HEUN, 1993). WEBER und MAY (1989) legten 15 – 30 Wiederholungen fest. Viele Autoren lassen diese Frage ganz offen. In dieser Arbeit wurde die Mindestzahl an Wiederholungen bei Dinucleotiden, wie bei SENIOR und HEUN (1993) beschrieben, auf 5 heruntersetzt.

Mikrosatelliten lassen sich in 3 Typen einteilen. Zu den einfachen Mikrosatelliten zählen die perfekten SSRs, deren Motive ohne Unterbrechungen wiederholt werden, und imperfekte Mikrosatelliten, deren Wiederholung von einem oder mehreren bp unterbrochen werden. Diese SSRs werden auch „interrupted SSRs“ genannt (LORIDON et al. 1998, BUTCHER et al. 2000) Zum dritten Typ gehören die zusammengesetzten SSRs, bei denen 2 oder mehrere Motive direkt aufeinander folgen. Dabei können perfekte sowie imperfekte Mikrosatelliten in einem SSR verbunden sein. Eine Übersicht gibt Tab. 1.1.

Tab. 1.1: Übersicht über die Einteilung der SSRs in Typen.

SSR-Typ	Definition	Beispiel
perfekt	Motivwiederholungen ohne Unterbrechungen	(GA) ₈
imperfekt	Motive unterbrochen durch ein oder mehrere bp	(CA) ₄ GA(CA) ₁₉
zusammengesetzt	Mehrere Motive folgen aufeinander	(TA) ₁₄ (CA) ₃ T(CA) ₆

SSRs kommen bei Prokaryonten (MOXON et al. 1994) sowie bei Eukaryonten (TAUTZ und RENZ 1984, LAGERCRANTZ et al. 1993, WANG et al. 1994) vor und sind dabei zufällig im Genom verteilt (WEBER und MAY 1989 sowie LITT und LUTY 1989). Mikrosatelliten kommen jedoch auch in Organellen-DNA vor. So fanden WANG et al. 1994 in der Genbank in Chloroplasten SSRs (cpSSRs). CATO und RICHARDSON konnten 1996 mit cpSSRs nachweisen, daß bei Coniferen die Chloroplasten größtenteils paternal vererbt werden.

Über die Funktionen von Mikrosatelliten ist noch sehr wenig bekannt. Hier gibt es vielfältige Hypothesen: Anfangs wurde von TAUTZ (1989) vermutet, daß die SSRs keinerlei Funktion im Genom ausüben. Bewiesen ist jetzt, daß diese „Müll-DNA“ (MOXON und WILLS 1999) z. T. innerhalb von Genen (AKKAYA et al. 1992, BROOK et al. 1992, FU et al. 1992, CASKEY et al. 1992, BLAIR und MCCOUCH 1997), jedoch öfter in deren Nähe liegt (KOSTIA et al. 1995, BLIGH et al. 1995, SHARIFLOU und SHARP 1999). Als Beispiele seien hier ein SSR im Intron des menschlichen Herzmuskel-Aktin-Gens (HAMADA et al. 1982a) und des „major histocompatibility complex“ (AMMER et al. 1992) sowie der 5' untranslatierte Bereich des HLA-F-Antigens (EPPLEN et al. 1996) genannt. Dabei handelt es sich bei Mikrosatelliten, die innerhalb von Genen liegen, größtenteils um G/C-haltige Triplets (BROOK et al. 1992, WANG et al. 1994, BROWN et al. 1996). Die meisten SSRs wurden aber in nicht kodierenden Bereichen entdeckt.

Aufgrund dessen, daß alternierende Purin-/Pyrimidin-Einheiten wie $(GT)_n$ und $(GC)_n$ eine Z-DNA-Struktur ausbilden können (HAMADA et al. 1982b), wird den SSRs Funktionen beim Verpacken und Kondensieren der DNA zu Metaphase-Chromosomen (STALLINGS et al. 1991), aber auch Enhancer-Funktionen z. B. für Chloramphenicol Acetyltransferase (CAT) (HAMADA et al. 1984) und der genetischen Rekombination (PARDUE et al. 1987) zugeschrieben. SSRs sollen die Rolle von Bindungsstellen für Enzyme durch die Ausbildung von Sekundärstrukturen übernehmen (VALLE 1993). Sie sollen aber auch als Bindungsstellen für regulatorische Proteine dienen, wobei diese eine Mindestlänge von 13 Wiederholungen aufweisen müssen, damit DNA-bindende Proteine hier ansetzen können (EPPLEN et al. 1996).

Eine sehr interessante Hypothese haben 1999 MOXON und WILLS aufgestellt. Sie beruht auf der Grundlage des hohen Polymorphiegrades von SSRs (LITT und LUTY 1989, WEBER und MAY 1989). Mit Hilfe dieser „Stottertexte im Genom“ (MOXON und WILLS 1999) soll die Evolution beschleunigt worden sein, denn die Mutationsrate ist in Mikrosatelliten gegenüber codierenden Sequenzen um ein vielfaches höher. So sei die Verkürzung oder Verlängerung eines SSRs um ein Motiv 10.000mal wahrscheinlicher als die Punktmutation in einem Gen. Dieses und die Nähe zu Genen und damit deren möglicher Einfluß auf deren Expression mache es dem Organismus leichter, sich auf Veränderungen in der Umwelt einzustellen. Die Autoren gehen sogar

so weit zu vermuten, daß sich das menschliche Gehirn erst durch die SSRs so schnell entwickeln konnte. Sie stützen ihre Vermutung darauf, daß eine Vielzahl von vererbaren neurologischen Krankheiten auf Veränderungen von Triplet-Wiederholungen innerhalb oder in direkter Nachbarschaft der betroffenen Gene beruhen. Die Polymorphismen dieser Triplet-SSRs dienen bereits als etablierte Nachweismethode für diese Krankheiten. Diese neurologischen Störungen seien die negativen Auswirkungen der schnellen Evolution, die damit „der genetische Preis für die rapide Entwicklung des menschlichen Gehirns“ (MOXON und WILLS 1999) sein sollen.

Die hohe Mutationsrate in SSRs kommt entweder – wie auch für Minisatelliten angenommen – durch „ungleiches Crossover“ (SMITH 1976, MODRICH und LAHUE 1996) zwischen ähnlichen Wiederholungseinheiten oder durch sog. „slippage“-Ereignisse in der Replikation der DNA zustande (EFSTRATIODIS et al. 1980, LEVINSON und GUTMAN 1987, SMEETS et al. 1989, LUTY et al. 1990 und AYRES SIA et al. 1997).

Die Abb. 1.1 von MOXON und WILLS (1999) soll diesen Vorgang der „Versetzungs-Fehlpaarung“ oder „slipped-strand misparing“ (SSM) (LEVINSON und GUTMAN 1987) während der Replikation verdeutlichen. Bei der Verdoppelung der DNA wird ein DNA-Strang durchgängig repliziert. Der andere Strang wird in Bruchstücken verdoppelt. Während des direkten Ablese- und Replikationsvorgangs kommt es zu keinem Fehler. Erst beim Zusammensetzen der neuen DNA-Abschnitte mit der alten Sequenz kann es zur fehlerhaften Paarung durch „Loop-Bildungen“ kommen: Einerseits kann sich im neuen Strang ein „Loop“ (eine Schlaufe) bilden, so daß der alte vermeidlich länger als der neue DNA-Abschnitt ist. Die Polymerase erkennt an dieser Stelle einen angeblichen „Fehler“ und baut neue Nukleotide in den neuen DNA-Strang ein. Dieser ist nun durch den dabei „übersehenen“ Loop verlängert. Andererseits kann der neue Strang auch verkürzt werden, indem im alten Strang ein Loop entsteht. Nach der Vereinigung der beiden Stränge liegt der alte Strang durch diese Schlaufe verkürzt vor. Die Polymerase erkennt hier wiederum einen angeblichen „Fehler“ und entfernt die vermeidlich überschüssigen Motive. Der neue DNA-Strang wurde nun um die Loop-Größe im alten Strang verkürzt.

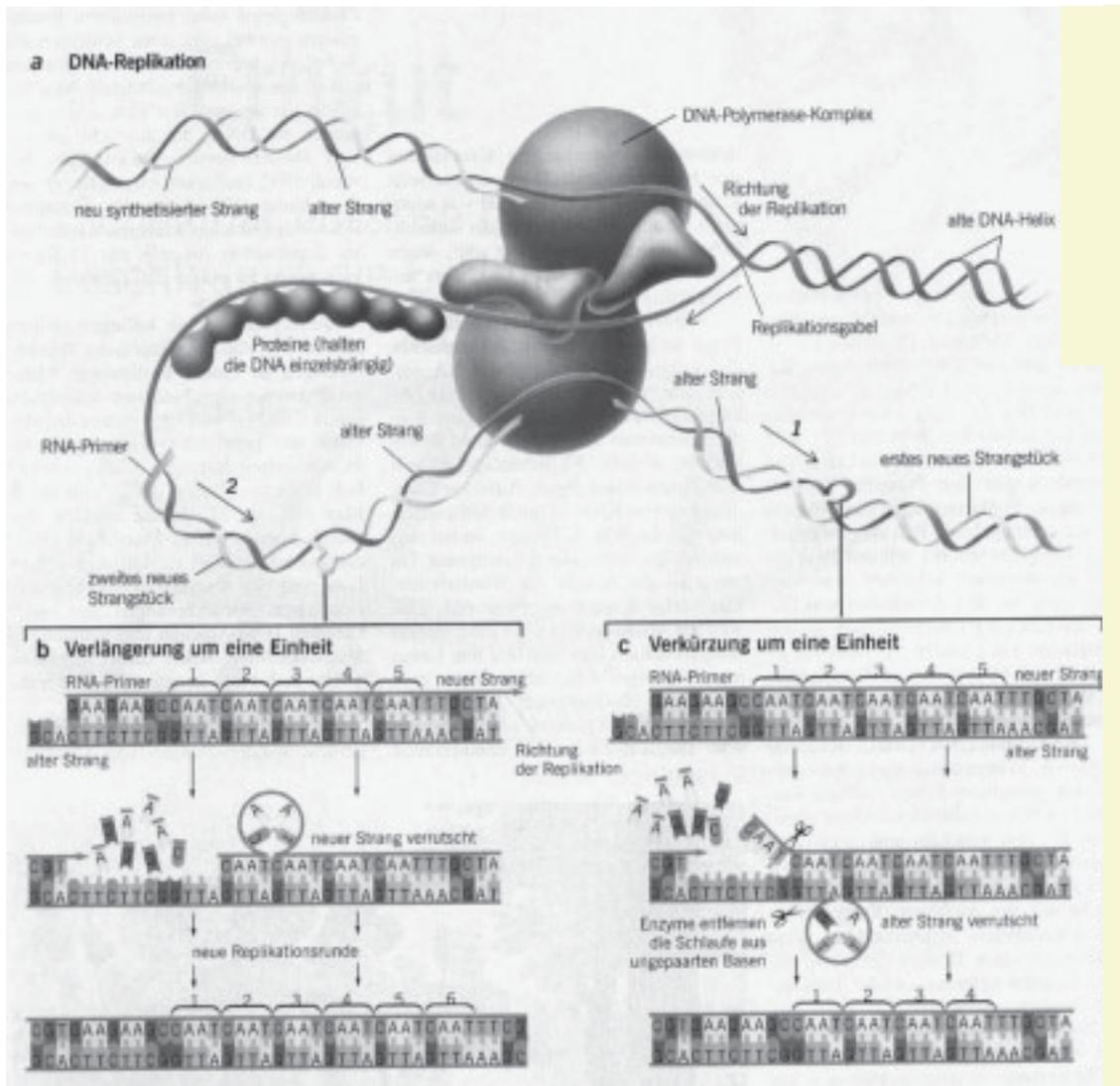


Abb. 1.1: Entstehung von „Versetzung-Fehlpaarungen“ bei der DNA-Replikation, Schema aus MOXON und WILLS (1999).

Mit diesem Modell lassen sich jedoch nicht alle VNTPs erklären. So haben KOSTIA et al. 1995 durch Sequenzierungen von SSRs gezeigt, daß auch Veränderungen in den flankierenden Regionen – hier eine 17 bp-Duplikation – entstehen können. Andere Autoren berichten ebenfalls von Insertionen oder Deletionen in den flankierenden Regionen oder von Unterbrechungen perfekter SSR-Motive (BLANQUER-MAUNONT und CROUAU-ROY 1995, GARZA et al. 1995, DEKA et al. 1995, CROUAU-ROY et al. 1996). Auffällig ist jedoch, daß die Polymorphismen innerhalb der SSRs immer die Größe ihrer Einheiten aufweisen. So zeigen Dinukleotid-Einheiten variable Größen von 2 bp und Trinukleotid-Motive Unterschiede von 3 bp (AKKAYA et al. 1992). Dabei

segregieren die SSRs codominant (AKKAYA et al. 1992), sind aber mit 1%iger Alteration innerhalb der Individuen stabil (AKAGI et al. 1997). Durch gezielte Mutationen zweier Enzymkomplexe des Reparatursystems bei Hefe konnten aber AYRES SIA et al. (1997) die Stabilität von SSRs während der Replikation des Genoms reproduzierbar aufheben. Sie konnten dabei demonstrieren, daß die Fähigkeit der korrekten Reparatur von „slippage“-Ereignissen in den untersuchten Enzymkomplexen unterschiedlich ist und mit der Größe der Repeat-Einheiten nachläßt.

1.3 Mikrosatelliten als molekulare Marker

Mikrosatelliten kommen im pflanzlichen Genom nicht so häufig vor wie im Säugetier-Genom (LAGERCRANTZ et al. 1993, MORGANTE und OLIVIERI 1993). Doch treten sie in *Brassica napus* ungefähr alle 29 kb auf (LAGERCRANTZ et al. 1993) und bilden damit eine extrem hohe Anzahl an potentiellen PCR-Markern. SSR-Marker kombinieren weiterhin die Verlässlichkeit und codominante Auswertbarkeit von RFLP-Markern mit einer einfachen und schnellen PCR-Reaktion, (AKKAYA et al. 1992, MORGANTE und OLIVIERI 1993) gefolgt von einer gelektrophoretischen Auftrennung der amplifizierten polymorphen Loci sowie ihrer einfachen Auswertbarkeit, weil es sich hier um Marker handelt, die nur einen Locus betreffen (TAUTZ 1989). Außerdem haben Untersuchungen zahlreicher Autoren gezeigt, daß SSRs einen höheren Polymorphiegrad aufweisen als RFLP-Marker (SENIOR und HEUN 1993, AKAGI et al. 1997 und BUTCHER et al. 2000). So fanden LITT und LUTY (1989) bis zu 12 Allele pro SSR und WEBER und MAY (1989) 4 bis 11 Allele bei humanen Mikrosatelliten. Innerhalb der Pflanzen-Spezies kann die Anzahl der Allele jedoch beträchtlich variieren (UZUNOVA und ECKE 1999). Im Reis wurden bis 25 Allele (MCCOUCH et al. 1997), in der Sojabohne bis zu 26 Allele (RONGWEN et al. 1995) pro SSR identifiziert. Beim Raps sind dagegen nur 1 bis 3 Allele von UZUNOVA und ECKE (1999) gefunden worden. Auch bei *Arabidopsis thaliana* und bei Hirse ist die Anzahl der Allele mit 2 bis 6 gering (BELL und ECKER 1994, BROWN et al. 1996).

Aufgrund dieser hoch informativen Eigenschaft und der leichten Nachweismethode wurden Mikrosatelliten in vielen agrar- und forstökonomisch interessanten Pflanzen

bereits untersucht. Nachstehend ist in der Tabelle eine Auswahl untersuchter Pflanzenarten aufgelistet.

Tab. 1.2: Pflanzen, in denen SSRs identifiziert wurden.

Pflanze	Quelle	Pflanze	Quelle
Sojabohne	AKKAYA et al. 1992	Kichererbse	SHARMA et al. 1995
Wein	THOMAS und SCOTT 1993	Hirse	BROWN et al. 1996
	MORGANTE et al. 1994	Eukalyptus	BYRNE et al. 1996,
Mais	SENIOR und HEUN 1993	Kartoffel	PROVAN et al. 1996
Reis	WU und TANKSLEY 1993,		BRONDANI et al. 1998
	AKAGI et al. 1997	Kiefer	ECHT und MAY-MARQUARDT 1997,
<i>Brassica</i>	LAGERCRANTZ et al. 1993,		DEVEY et al. 1999
	KRESOVICH et al. 1995	<i>Asteraceae</i>	WHITTON et al. 1997
Avokado	LAVI et al. 1994	Pappel	DAYANANDAN et al. 1998
<i>Arabidopsis</i>	BELL und ECKER 1994	Sonnenblume	DEHMER und FRIED 1998
<i>Dioscorea</i>	TERAUCHI und KONUMA	Spinat	GROBEN und WRICKE 1998
	1994	Zuckerrübe	GROBEN 1998
Gerste	BECKER und HEUN 1995	Teebaum	ROSSETTO et al. 1999
Zitrusfrüchte	KIJAS et al. 1995	Akazie	BUTCHER et al. 2000
Buche	DOW et al. 1995,	Gummibaum	LESPINASSE et al. 2000
	STEINKELLNER et al. 1997	Kokosnuß	TEULAT et al. 2000
Weizen	RÖDER et al. 1995	Luzerne	MENGONI et al. 2000

Obwohl die Mikrosatelliten erst vor 20 Jahren identifiziert und ihre Verwendung als molekulare Marker erst vor 12 Jahren vorgeschlagen wurde, ist der Einsatz von „simple sequence length polymorphisms“ (SSLPs) (CHEN et al. 1997) in der Pflanzenzüchtung beträchtlich und vielfältig: So können sie in der Qualitätskontrolle von Saatgut (AKAGI et al. 1997), bei der markergestützten Selektion und Populationsanalysen (BELL und ECKER 1994), für Untersuchungen der Gendrift (BUTCHER et al. 2000), Sortenidentifizierung (AKAGI et al. 1997), Verwandtschaftsuntersuchungen (AKAGI et al. 1997), aber auch als „Anker-Marker“ zum Abgleich von Kopplungskarten verwendet werden (UZUNOVA und ECKE 1999). Für viele dieser Studien werden jedoch kartierte und damit im Genom lokalisierte Mikrosatelliten benötigt. Deswegen gibt es auch hier bereits eine immer weiter ansteigende Anzahl kartierter SSR-Marker, die in bereits bestehende Genom-Karten integriert wurden, so z. B. bei Sojabohne (AKKAYA et al.

1992, MORGANTE et al. 1994), Reis (WU und TANKSLEY 1993, Arabidopsis (BELL und ECKER 1994), Raps (UZUNOVA und ECKE 1999), Gerste (BECKER und HEUN 1995), Weizen (RÖDER et al. 1995), Mais (TARAMINO und TINGEY 1996) und Gummibaum (LESPINASSE et al. 2000).

Mikrosatelliten-Sequenzen können allerdings auch auf eine andere Weise als Marker genutzt werden. Und zwar indem die SSRs selbst als Primer für eine PCR verwendet werden. Diese Primer werden an ihrem 3'- oder 5'-Ende durch spezifische Nukleotide „verankert“ (ZIETKIEWITZ et al. 1994), wobei diese Verankerungen auch degeneriert sein können (FISCHER et al. 1996). Durch die PCR werden Regionen zwischen 2 SSR-Loci amplifiziert. Mit diesem „inter-SSR- (ISSR-) Fingerprinting“ (ZIETKIEWITZ et al. 1994, KOSTIA et al. 1995 und FISCHER et al. 1996) oder auch „random amplified microsatellite polymorphic fragments“ (RAMPs) (SANCHEZ DE LA HOZ et al. 1996) genannt, können bis zu 40 Marker mit einem SSR-Primer abgelesen werden. Das „ISSR-Fingerprinting“ wurde bereits für Untersuchungen der somaklonalen Variation erfolgreich angewendet. Es wurde hier eingesetzt, um eine schnelle Massenanalyse auf PCR-Basis mit der Zuverlässigkeit von RFLP-Markern zu verknüpfen (ALBANI und WILKINSON 1990). ISSR-Marker können weiterhin sinnvoll für Identifikationstests und Populationsstudien (CHARTERS et al. 1996, PREVOST und WILKINSON 1999) eingesetzt werden.

1.4 Ziele dieser Arbeit

Während die Verwendung von Mikrosatelliten als molekulare Marker als einfache, schnelle und kostengünstige Methode beschrieben wird (KRESOVICH et al. 1995, BLAIR und MCCOUCH 1997), ist die Identifizierung und Entwicklung von SSRs zur Nutzung als Marker mit hohen Kosten verbunden. Um die Mikrosatelliten jedoch optimal für züchterische Zwecke nutzen zu können, ist eine möglichst hohe Abdeckung des Genoms mit Mikrosatelliten von großer Bedeutung.

In Anlehnung an die vorbereitenden Arbeiten von UZUNOVA und ECKE (1999) war daher das Ziel dieser Arbeit, einen größeren Satz an Mikrosatelliten aus dem *Brassica napus*-Genom zu identifizieren und zu charakterisieren, damit sie als molekulare

Marker beim Raps und verwandten Arten genutzt werden können. Dabei soll die Nutzung der Marker für Massenanalysen optimiert werden.

Bei der Anwendung von molekularen Markern – wie die zu entwickelnden Mikrosatelliten-Marker – im Raps ist dabei zu beachten, daß dieser ein amphidiploides Genom (AACC) besitzt, daß sich aus dem diploiden A-Genom von *Brassica rapa* und C-Genom von *Brassica oleracea* zusammensetzt. Da dies die Verwendung von molekularen Markern erschweren kann, soll die Verwendbarkeit der Mikrosatelliten in diesen drei verwandten Arten sowie in dem phylogenetisch weiter entfernten diploiden B-Genom von *Brassica nigra* und den beiden daraus resultierenden amphidiploiden *Brassica carinata* (BBAA) und *Brassica juncea* (BBCC) untersucht werden. Dabei standen jedoch die Bestimmung des Polymorphiegrades bei *Brassica napus* und seinen Ursprungsgenomen *Brassica rapa* und *Brassica oleracea* (U'sches Dreieck, U 1935) im Vordergrund.

Zur Isolierung von SSRs sollten GA- und CA-Motive verwendet werden. Mit ca. 50.000 bis 100.000 CA-SSRs kommt das CA-Motiv im menschlichen und im Maus-Genom alle 30 bis 60 Kilobasen (kb) vor und ist somit die häufigste SSR-Einheit in *Mammalia*, gefolgt von dem GA-Motiv (HAMADA und KAKUNAGA 1982, HAMADA et al. 1984, BRAATEN et al. 1988 und STALLINGS et al. 1991). Bei Pflanzen sieht die Verteilung der SSRs anders aus: Mikrosatelliten kommen hier 5fach seltener vor. Am häufigsten treten in Pflanzen SSRs mit AT-Motiven auf (LAGERCRANTZ et al. 1993, MORGANTE und OLIVIERI 1993, WANG et al. 1994), die zudem auch einen hohen Polymorphismus aufweisen (AKAGI et al. 1997). Diese Mikrosatelliten erzielen jedoch aufgrund ihrer Selbstkompatibilität oft keine reproduzierbaren Ergebnisse (LAGERCRANTZ et al. 1993, BELL und ECKER 1994). Das AT-Motiv brachte bereits in der Hybridisierung mit dieser entsprechenden Sonde keine Signale (MÖRCHEN et al. 1996). Deswegen fiel in dieser Arbeit zum Durchsuchen einer genomischen DNA-Bank von Raps die Wahl auf die weniger oft vorkommenden GA- und CA-Motive. Diese kommen nach BELL und ECKER (1994) in *Arabidopsis* alle 244 kb bzw. 430 kb und nach LAGERCRANTZ et al. (1993) im *Brassica napus* Genom alle 125 kb (GA-Motiv) bzw. 350 kb (CA-Motiv) vor.

Als Ausgangsmaterial standen genomische DNA-Phagen-Banken von UZUNOVA und ECKE (1999) der beiden Raps-Sorten ‚Mansholt’s Hamburger Raps‘(im folgenden als ‚Mansholts‘ bezeichnet) und ‚Samourai‘ zur Verfügung, die gleichzeitig die Eltern der doppelt haploiden Kartierungspopulation einer von UZUNOVA et al. 1995 erstellten RFLP-Kopplungskarte waren. In diese Karte sollen so viele SSR-Marker wie möglich integriert werden, damit die in der Arbeit entwickelten Mikrosatelliten-Marker in einem möglichst breiten Analyse-Spektrum für züchterische Zwecke und in der Grundlagenforschung optimal genutzt werden können.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Enzyme

Die verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen Merck (Darmstadt) oder Sigma (St. Louis, USA) bezogen. Sie hatten den Reinheitsgrad „pro analysis“. Eine Chemikalien- und Enzymliste ist im Anhang A aufgeführt.

2.1.2 Behandlung von Geräten und Lösungen

Alle hitzestabilen Geräte und Lösungen wurden zur Nukleaseinaktivierung für 20 min bei 121 °C und 2×10^5 Pa sterilisiert. Kleingeräte aus Metall wurden mit 96%igem (v/v) Ethanol gespült und abgeflammt. Hitzelabile Lösungen wurden steril filtriert (Porengröße 0,2 µm, Schleicher und Schuell, Dassel).

2.1.3 Oligonukleotide

Die zur Herstellung der Standards und zum Sequenzieren verwendeten Oligonukleotide sind in Tab. 2.1 aufgeführt.

Tab. 2.1: Verwendete Oligonukleotide.**a: PCR-Primer**

Name	Sequenz	Verwendung
KS	TCGAGGTCGACGGTATC	Primer zur Amplifikation des Standards 71 bp via PCR
M13rev	GGAAACAGCTATGACCATG	Primer zur Amplifikation des Standards 227 bp via PCR
M13seq	GTAAAACGACGGCCAGT	Primer zur Amplifikation des Standards 140 bp via PCR
M13seqC5	GTAAAACGACGGCCAGT	Cy5-markierter Primer zur Amplifikation der Standards 192, 227, 250, 300 und 350 bp via PCR
M250	ACTGCGGATAACAATTTTAC	Primer zur Amplifikation des Standards 250 bp via PCR
M300	ACCCAGGCTTTACACTTTA	Primer zur Amplifikation des Standards 300 bp via PCR
M350	GCGGGCAGTGAGCGCAACGC	Primer zur Amplifikation der Standards 325 und 350 bp via PCR
SKCy5	CGCTCTAGAACTAGTGGATC	Cy5-markierter Primer zur Amplifikation der Standards 71, 115 und 140 bp via PCR
T3	AATTAACCCTCACTAAAGGG	Primer zur Amplifikation des Standards 192 bp via PCR
T7	GTAATACGACTCACTATAGGGC	Primer zur Amplifikation des Standards 115 bp via PCR
T7SCy5	GTAATACGACTCACTATAGG	Cy5-markierter Primer zur Amplifikation des Standards 325 bp via PCR

Tab. 2.1 Fortsetzung: Verwendete Oligonukleotide**b: Sequenzierungsprimer**

Name	Sequenz	Verwendung
M13-20C5	GTAAAACGACGGCCAGT	universeller Primer vor der MCS von pBKCMV, Cy5-markiert
pBKCMVFC	GCCGCTCTAGAAGTACTCTC	spez. pBKCMV Primer direkt vor der MCS von pBKCMV, Cy5-markiert
pBKCMVRC	CAGGAAACAGCTATGAC	verkürzter BK reverse Primer hinter der MCS von pBKCMV, Cy5-markiert

Die Primer wurden in sterilem H₂O gelöst. Die Konzentrationen für diese Primer-Stocklösungen betragen für die Sequenzierungsprimer 2 µM und für PCR-Primer 10 µM. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

2.1.4 DNA-Längenmarker

Die verwendeten DNA-Längenmarker sind nachfolgend mit Angabe der Fragmentgröße aufgeführt:

λ-DNA, HindIII und EcoRI geschnitten (New England Biolabs, Beverly, USA):

Fragmentgrößen in bp: 21.266, 5.148, 4.973, 4.277, 3.530, 2.027, 1.904, 1.584, 1.330, 983, 831, 564, 125

Lambda DNA/Eco130I(StyI) Marker (MBI Fermentas, St.-Leon-Rot):

Fragmentgrößen in bp: 23.583, 19.329, 7.743, 6.223, 4.254, 3.472, 2.690, 1.882, 1.489, 925, 421, 74

100 bp DNA Ladder (GIBCO BRL Life Technologies, Karlsruhe):

Fragmentgrößen in bp: 2.072, 1.500, 1.400, 1.300, 1.200, 1.100, 1.000, 900, 800,
700, 600, 500, 400, 300, 200, 100

10 bp DNA Ladder (GIBCO BRL Life Technologies, Karlsruhe):

Fragmentgrößen in bp: 1.668, 330, 320, 310, 300, 290, 280, 270, 260, 250 ... 10

2.1.5 Bakterienstämme und Vektoren

Für die Erstellung der genomischen DNA-Phagen-Bank wurde der *E. coli*-Stamm XL1-Blue MRF' (Stratagene, La Jolla, USA) benutzt. Bei der Infektion der Bakterien mit dem λ ZAP Express™ Phagemid zum Durchsuchen der genomischen DNA-Bank wurde der *E. coli*-Stamm K802 (WOOD 1966) verwendet. Zum Herausschneiden der Plasmid-DNA pBK-CMV aus dem λ ZAP Express™ Phagemid fand wiederum XL1-BlueMRF' Verwendung, hier jedoch in Verbindung mit dem Helferphagen ExAssist™ (Stratagene, La Jolla, USA). Alle Mikrosatelliten-Motive tragenden Klone wurden in Form von XL1-Blue MRF' Bakterien als Stammkulturen bei -80 °C gelagert.

Als Standard-DNA zur Größenbestimmung von DNA-Fragmenten in der Gelelektrophorese dienten PCR-Amplifikationsprodukte des Plasmids pBluescrip II SK(+) von der Firma Stratagene (La Jolla, USA).

2.1.6 Bakteriennährmedien und -anzucht

E. coli XL1-Blue MRF' (Kap. 2.1.5) wurde in 20 ml LB-Medium 10 mM MgSO₄ sowie 0,2% (w/v) Maltose angezogen. Für die Anzucht von K802 (Kap. 2.1.5) wurden 10 ml des Mediums verwendet. Zur Anzucht von *E. coli* für Mini Plasmid-DNA-Isolierungen reichten ebenfalls 10 ml Volumina. Die Anzucht erfolgte hier in LB-Medium mit 50 µg/ml Kanamycin zur Selektion auf das pBKCMV-Plasmid.

Alle ÜN Flüssigkulturen wurden in einem Erlenmeyerkolben 14 bis 16 Stunden auf einem Rundschtüttler (200 rpm, Centromat®M, Schütt Labortechnik, Göttingen) bei

37 °C geschwenkt. Diese konnten als 2 ml Aliquots bei 15.000 rpm, 1 min und RT (Hettich Mikroliter, Rotor: 1394, Hettich Zenrifugen, Tuttlingen) abzentrifugiert werden und waren so als Bakterienpellets bei -20 °C über mehrere Monate haltbar.

LB-Medium: 1 g/l Hefeextrakt
5 g/l Pepton (Kasein)
10 g/l NaCl
pH 7,0 einstellen
autoklavieren

20% Maltose-Stammlösung steril filtrieren, bei 4 °C lagern

1 M MgSO₄: steril filtrieren

Zur Herstellung von Agarplatten wurde dem Medium 1,5% (w/v) Agar hinzugefügt.

YT-Medium: 5 g/l NaCl
5 g/l Hefeextrakt
8 g/l Bacto-Trypton
pH 7,5 einstellen
autoklavieren

2.1.7 Erstellung der Bakterien-Stammkulturen

Die Anzucht erfolgte in 100 ml Erlenmeyerkolben auf einem Rundschüttler (Centromat®M, Schütt Labortechnik, Göttingen) bei 200 rpm und 37 °C. Für die Herstellung der *E. coli* XL1-Blue MRF⁷ Stammkulturen wurden die Zellen in 25 ml LB-Medium bis zur exponentiellen Wachstumsphase (OD_{600 nm} von 0,7 bis 1,0) angezogen. Als Selektionsmittel diente 50 µl/ml Kanamycin. Je 850 µl der Zellsuspension wurden mit 150 µl 100%igem Glycerin (v/v) versetzt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Stammkulturen erfolgte bei -80 °C.

2.1.8 Antibiotika

Als Selektionsmittel für die beiden verwendeten Vektoren dienten die Antibiotika Ampicillin und Kanamycin. Die verwendeten Konzentrationen sind in der folgenden Tabelle angegeben (Tab. 2.2):

Tab. 2.2: Für die Selektion verwendete Antibiotika.

Plasmid	Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration
pBK-CMV	Kanamycin	50 mg/ ml	50 mg/ l
pBluescript II KS(+)	Ampicillin	250 mg/ ml	100 mg/ l

2.1.9 Pflanzenmaterial

In einer Vorprüfung wurde die Verwendbarkeit der in dieser Arbeit erstellten locus-spezifischen Mikrosatelliten-Primerpaare in der PCR geprüft. Hierzu wurden die Eltern der DH-Kartierungspopulation, die DH-Linien ‚Mansholt 5.1‘ (DH5.1) bzw. ‚Mansholt 5.2‘ (DH5.2) und ‚Samourai‘ (DH11.4) (UZUNOVA et al. 1995) sowie deren F₁ verwendet. Das Schema für die Erstellung der Kartierungspopulation (UZUNOVA 1994) ist in Abb. 2.1 dargestellt.

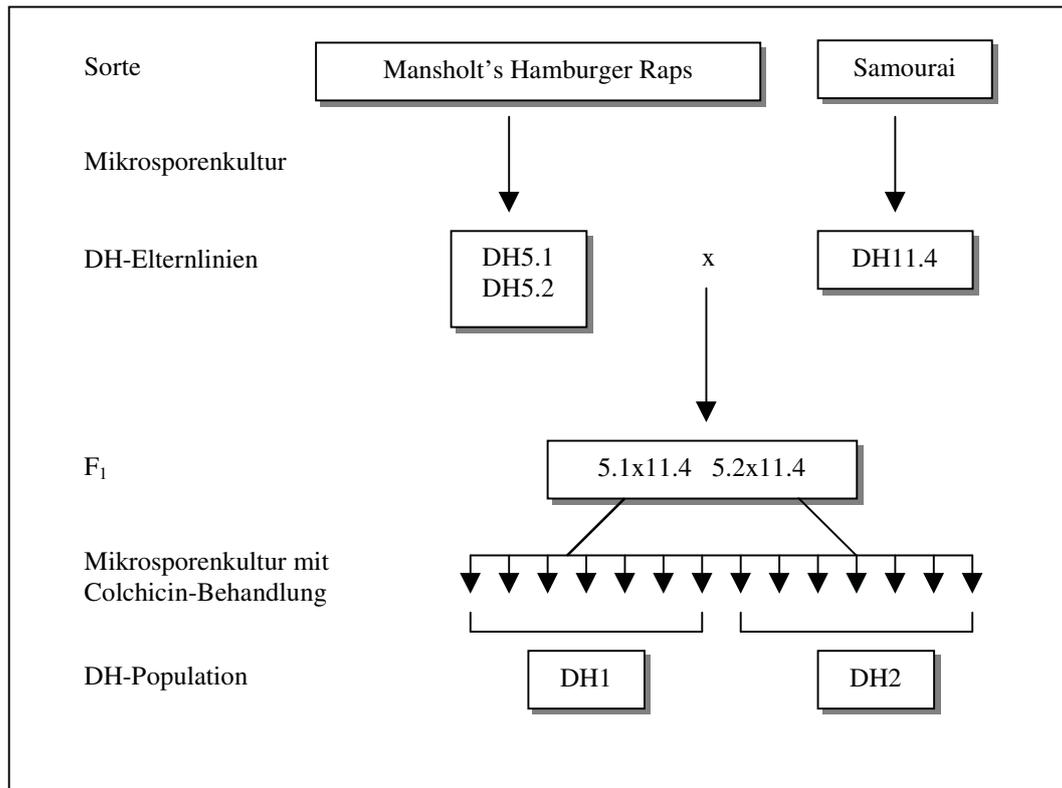


Abb. 2.1: Schema der Herstellung der doppelt haploiden Kartierungspopulation (nach UZUNOVA 1994).

Die Verwendung dieser Linien in der Vorprüfung hatte den Vorteil, daß neben der Anwendbarkeit der Primerpaare in der PCR gleichzeitig polymorphe Primerpaare in der Kartierungspopulation erkannt werden konnten. Diese wurden in einer Population von 151 DH-Linien aus der oben genannten Kreuzung kartiert und in die von UZUNOVA et al. (1995) erstellte RFLP-Karte integriert.

Das Brassicaceen-Sortiment zur Charakterisierung der Mikrosatelliten-Marker wurde mit dem Ziel zusammengestellt, innerhalb der *Brassicaceae*, besonders aber im Winterraps, eine möglichst große genetische Vielfalt abzudecken. Das Winterraps-Sortiment beinhaltete 18 europäische Genotypen und die asiatische Sorte ‚Italy‘. In diesem Material befinden sich neue Linienentwicklungen wie ‚Bristol‘ und ‚Express‘ sowie ältere Populationssorten wie ‚Mansholt‘ und ‚Lenora‘ (Anhang B). Die Sommer-raps-Sorten setzten sich aus 15 europäischen, 3 kanadischen und einem australischen Genotyp(en) zusammen. Ein Teil des Raps-Sortiments wurde mit den von der

Saatenunion (Leopoldshöhe) verwendeten Sorten für eine spätere Nutzung der SSR-Marker ausgesucht. Zusätzlich wurden je 3 Sorten aus *Brassica rapa* und *Brassica oleracea* gewählt, die unterschiedlichen Subspezies zugeordnet werden. Für die weiteren Arten aus dem U'schen Dreieck (U 1935) wurden Genotypen aus dem Göttinger Sortiment verwendet. Alle verwendeten *Brassica*-Genotypen sind in Anhang B aufgeführt.

Die Aussaat der Pflanzen erfolgte in Multitopfplatten, gefüllt mit einem Gemisch aus drei Teilen Fruhstorfer Erde Typ T (Industrie-Erdenwerk Archut, Lauterbach; 50% Hochmoortorf, 35% Vulkanton, 15% Rindenumus) und einem Teil Sand. Diese wurden im Gewächshaus mit Hilfe einer Zusatzbeleuchtung (Phillips-400 W-Lampe, Glühbirne SON-T AGRO 400) in einem Tag/ Nacht-Rhythmus von 16 h/ 8 h kultiviert. Nach 2 bis 3 Wochen wurden pro Pflanze 2 Blätter geerntet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Pro Genotyp wurden 7 bis 10 Pflanzen ausgesät und Mischproben aus diesen Pflanzen geerntet. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Übersicht über die Methodik zur Identifizierung, Charakterisierung und Kartierung von Mikrosatelliten-Markern

Zur Überschaubarkeit der in dieser Arbeit durchgeführten Methoden, sind nachfolgend die einzelnen Schritte der Entwicklung, Charakterisierung und Kartierung von Mikrosatelliten-Markern für den Raps schematisch dargestellt (Abb. 2.2).

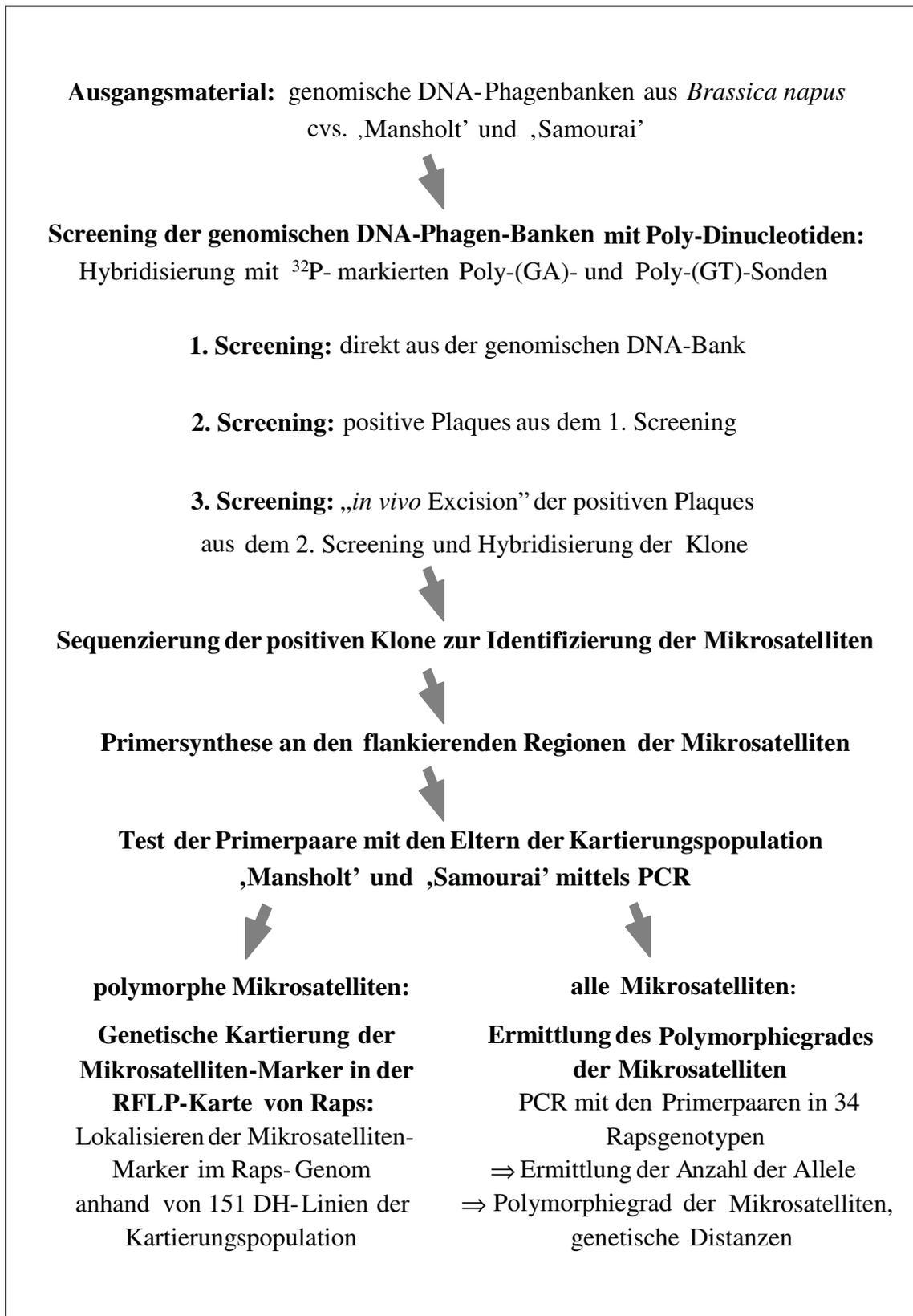


Abb. 2.2: Übersicht über die Schritte zur Identifizierung, Charakterisierung und Kartierung von Mikrosatelliten-Markern beim Raps (*Brassica napus* L.).

2.2.2 Durchsuchen der genomischen DNA-Phagen-Banken

Um Mikrosatelliten-Motive im Raps-Genom identifizieren zu können, wurden genomische DNA-Banken erstellt. Hierfür wurde von den Raps-DH-Linien ‚Mansholt‘ und ‚Samourai‘ (Kap. 2.1.9) Blattmaterial geerntet, aus dem genomische DNA nach UZUNOVA et al. (1995) isoliert wurde, mit den Restriktionsenzymen *Sau3A I* bzw. *Sau3A I* und *Pst I* geschnitten und längenfraktioniert. Zur Übertragung der restrin-gierten Raps-DNA in die Phagen wurden DNA-Fragmente verwendet, die Größen zwischen 200 und 800 bp aufweisen sollten. Als Vektor für die Verpackung der DNA wurde ‚ZAP Express™‘ von der Firma Stratagene Europe (Heidelberg) verwendet. Dieser war Bestandteil des ‚ZAP Express™ Predigested Vector Kit and ZAP Express™ Predigested Gigapack Cloning Kits‘. Die Ligation der DNA mit dem Vektor wurde nach Herstellerangaben vorgenommen. Diese Arbeiten wurden von Dr. Milena I. Uzunova durchgeführt und für diese Arbeit als Ausgangsmaterial zur Verfügung gestellt.

2.2.2.1 1. Screenen der DNA-Phagen-Banken

Zur Identifizierung der Mikrosatelliten in der Raps-DNA wurden folgende genomische DNA-Banken durchsucht (Tab. 2.3):

Tab. 2.3: Verwendete genomische DNA-Phagen-Banken.

Name	Herkunft der DNA	verwendetes		
		Restriktionsenzym	Vektor	pfu
MR	‚Mansholt‘	<i>Sau3AI</i>	ZAP Express™	45.000
MD	‚Samourai‘	<i>PstI, Sau3AI</i>	ZAP Express™	15.000

2.2.2.1.1 Herstellung der Phagenplatten

Um die genomische DNA-Bank auf Mikrosatelliten-Motive hin durchsuchen zu können, mußte zuerst eine Bakterienkultur erstellt und mit den Phagen infiziert werden. Die infizierten Zellen zeigten durch Lyse der Wirtsbakterien Plaques auf einem Bakterienrasen, die mit spezifischen radioaktiv markierten Mikrosatelliten-Sonden hybridisiert wurden.

Als Wirtsbakterium fand der *E. coli*-Stamm K802 (Kap. 2.1.5) Anwendung. Hierzu wurde eine ÜN-Kultur, wie in Kap. 2.1.6 beschrieben, angesetzt. Diese wurde 1:100 verdünnt und bei 37 °C und 200 rpm auf eine OD_{600 nm} von 1,0 angezogen. Das Wachstum der Kultur wurde durch Lagerung auf Eis gestoppt und die Bakterien-suspension in ein Falcon-Röhrchen überführt. Diese wurde 10 min bei 4 °C und 2.000 rpm abzentrifugiert (Sigma 4K 10, Rotor 11140), die Bakterien in 10 mM MgSO₄ resuspendiert und auf eine OD_{600 nm} von 0,5 bis 0,7 verdünnt. Die Bakterien-Suspension konnte 48 h bei 4 °C gelagert werden.

Aus der genomischen DNA-Bank wurden 2 µl zur Infektion von 200 µl K802-Suspension verwendet. Die infizierten Bakterien wurden 15 min bei 37 °C inkubiert, in 5 ml 47 °C warmen NZY-Top-Agar gegeben und kräftig gemischt bevor sie auf NZY-Broth-Agarplatten gleichmäßig verteilt wurden. Nach dem Aushärten der Platten wurden diese über Nacht bei 37 °C inkubiert. Bevor die Platten zum Blotten verwendet wurden, mußten diese mindestens 2 h bei 4 °C gelagert werden.

NZY-Broth-Agar: 16 g/l NZY-Broth
15 g/l Agar
pH 7,5 einstellen
autoklavieren

NZY-Top-Agar: 16 g/l NZY-Broth
7 g/l Agarose
pH 7,5 einstellen
autoklavieren
vor der Verwendung auf 47 °C vorwärmen

2.2.2.1.2 Herstellung der Phagenmembranen

Um alle Plaques aus der genomischen DNA-Bank von den gekühlten Agar-Platten auf die Membran übertragen zu können, wurden runde Hybond N+ (\varnothing 0,082 m, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) in der Größe der Petrischalen gewählt. Diese wurden trocken auf die Bakterienkultur gelegt. Die Lage der Membran auf den Agarplatten wurde durch Durchstechen der Membran mit einer in blaue Farblösung getauchten Nadel markiert.

Die Membran wurde 10 min auf der Agarplatte über Kopf bei 4 °C inkubiert. Nach Abziehen der Membran wurde diese mit der Phagenseite nach oben für 10 min auf drei Lagen, in 0,5 M NaOH getränktes Whatman 3MM Papier (Biometra, Göttingen) gelegt, um die DNA zu denaturieren. Weitere Inkubationen folgten in 1 M Tris-HCl pH 8,0 für 10 min und in 2x SSC für 5 min, um die Filter wieder in einen neutralen pH-Bereich zu bringen. Nach jeder Inkubation wurde die Membran kurz auf drei Lagen Whatman 3MM Papier (Biometra, Göttingen) gelegt. Zur Lagerung bei 4 °C wurde die Membran im trockenen Zustand in Frischhaltefolie eingewickelt.

Blaue Farblösung: 0,25% (w/v) Bromphenolblau
50% (w/v) Glycerin
0,1 M EDTA
steril filtrieren (0,2 μ m)

2x SSC: 0,3 M NaCl
30 mM Natriumcitrat
pH 7,0 einstellen
durch Faltenfilter 5951/2 (Schleicher & Schuell, Dassel) filtrieren
autoklavieren

2.2.2.1.3 Herstellung radioaktiv markierter Sonden

Als mikrosatellitenspezifische Hybridisierungssonden wurden poly(dA-dG)-poly(dC-dT) und poly(dA-dC)-poly(dG-dT) von Amersham Pharmacia Biotech

(Freiburg) verwendet. Beide Sonden konnten zusammen in einem Hybridisierungsansatz verwendet werden. Sie wurden nach Angaben des Herstellers mit 0,1 M NaCl und 0,02 M KH_2PO_4 (pH 7,0) auf eine Konzentration von 50 ng/ μl gebracht und bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

Die Markierung der DNA-Sonden mit radioaktivem $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ (ICN Biomedicals, Inc., Costa Mesa, CA, USA) erfolgte nach FEINBERG und VOGELSTEIN (1983) mit Hilfe des „Prime-It Random Primer Labelling Kits“ der Firma Stratagene Europe (Heidelberg). Dabei diente ein Gemisch aus Nona-Nukleotiden als „random primer“. Die DNA-Sonden sowie die Nonamer-Primer wurden 5 min bei $100\text{ }^\circ\text{C}$ im Wasserbad denaturiert. Alle anderen Komponenten des Markierungsansatzes wurden bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ zugegeben:

Markierungsansatz:	DNA-Sonden	150 ng
	Nonamer „random primer“	8 μl
	5x Reaktionspuffer	8 μl
	$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$	4 μl
	<u>„Klenow“-Fragment</u>	<u>1 U</u>
	H_2O	ad 40 μl

Dieser Ansatz wurde für 30 min bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Die Markierung wurde durch 5-minütiges Denaturieren bei $100\text{ }^\circ\text{C}$ gestoppt.

Um die Sondenmarkierung überprüfen zu können, wurden auf einer ca. 1,5 x 3 cm großen Hybond N+-Membran je 1 μl der beiden unmarkierten Sonden aufgetropft und für 30 min bei $60\text{ }^\circ\text{C}$ getrocknet. Dieser Dot Blot wurde mit den anderen Membranen zusammen hybridisiert.

2.2.2.1.4 Hybridisierung der Membranen

Die Hybridisierung der Membranen wurde nach einer modifizierten Methode von BERNATZKY und TANKSLEY (1986) durchgeführt. Sie erfolgte bei $65\text{ }^\circ\text{C}$ im Schwenkwasserbad (1083, GFL, Burgwedel) in einer Glasschale, was den Vorteil hatte,

daß bis zu 50 Membranen in einem Ansatz hybridisiert werden konnten. Dabei wurden für 20 Membranen 200 ml Hybridisierungslösung verwendet. Für je 10 weitere Membranen wurde das Volumen um 50 ml erhöht.

Um unspezifische Bindungsstellen auf den Membranen abzusättigen, erfolgte die Vorhybridisierung über Nacht. Die Hybridisierung selbst erfolgte ohne Wechsel der Lösung ebenfalls über Nacht. Hierzu wurde zu der denaturierten, radioaktiv markierten DNA-Sonde 200 µl Hybridisierungslösung addiert, bevor diese in die Lösung gegeben wurde.

Das Waschen der Membranen erfolgte ebenfalls in Glasschalen, im Wasserbad bei 65 °C. Hier genügten zwei Waschstufen, um die überschüssige Radioaktivität zu entfernen. Dazu wurden pro 20 Membranen 500 ml Waschpuffer I verwendet. Die Inkubation erfolgte für 5 min bei leichtem Schwenken. Durch kurzes Spülen in Waschpuffer II wurde die Restaktivität der Membranen auf 80 bis 100 Impulse/ min vermindert. Die Membranen wurden im feuchten Zustand in Plastikfolie eingeschweißt und mit Verstärkerfolien (Intas, Göttingen) bei -80 °C für 2 Tage auf Röntgenfilm (Hyperfilm-MP, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) exponiert.

Hybridisierungslösung: 5x SSC
 0,6% (w/v) SDS
 50 mM NaH₂PO₄
 5x Denhardt's
 1% (w/v) Blocking Reagenz
 durch 2 Lagen Gaze filtrieren

20x SSC: 3 M NaCl
 300 mM Natriumcitrat
 pH 7,0 einstellen
 durch Faltenfilter 5951/2 (Schleicher & Schuell, Dassel)
 filtrieren
 autoklavieren

8% Blocking Reagenz: 8 g Blocking Reagenz
 ad 100 ml 4x SSC
 in Wärme lösen

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

Waschpuffer II: 1x SSC
 0,05% (w/v) SDS

2.2.2.1.5 „Strippen“ der Membranen

Zeigten die Membranen keine Hybridisierungssignale oder war der Hintergrund zu dunkel, konnte die Radioaktivität durch sog. „Strippen“ der Membranen wieder heruntergewaschen werden. Dazu wurden die Membranen 10 min in kochender 0,5%iger (w/v) SDS-Lösung geschwenkt. Die Lösung wurde abgegossen, die Filter noch einmal mit kochender Lösung übergossen und solange geschwenkt, bis sie RT erreichten.

Da die Membranen nicht austrocknen durften, wurden sie entweder sofort in Folie geschweißt oder das „Strippen“ direkt vor der Rehybridisierung durchgeführt.

2.2.3 2. Screenen der DNA-Phagen-Banken

Im 2. Screening der genomischen DNA-Bank wurden Plaques, die in der ersten Hybridisierung positive Signale zeigten, vereinzelt und erneut hybridisiert. Dazu wurden diese Plaques mit Hilfe einer kurzen Pasteurpipette aus dem Agar herausgestochen und in 300 µl SM-Puffer resuspendiert. Diese Phagemidsuspension war bei 4 °C bis zu 6 Monaten haltbar.

Um die Phagemide zu vereinzeln, wurden diese gegebenenfalls 1:10 oder 1:100 in SM-Puffer verdünnt, und je 2 µl, wie in Kap. 2.2.2.1.1 beschrieben, ausplattiert. Die

Übertragung der Phagmide auf Hybond N⁺-Membranen sowie das Fixieren wurde, wie in Kap. 2.2.2.1.2 beschrieben, durchgeführt, wobei hier 6,5 x 6,5 cm Membranen (Amersham Pharmacia, Biotech, Freiburg) Verwendung fanden, da es nicht mehr darauf ankam, alle Plaques zu übertragen.

Die Sondenmarkierung und die Hybridisierung erfolgte ebenfalls wie im 1. Screening beschrieben (Kap. 2.2.2.1.3 und Kap. 2.2.2.1.4), was den Vorteil hatte, daß Membranen aus dem ersten und 2. Screening zusammen in einem Ansatz hybridisiert werden konnten.

SM-Puffer: 100 mM NaCl
 10 mM MgSO₄ x 7 H₂O
 50 mM Tris-HCl pH 7,5
 0,01% (w/v) Gelatine
 steril filtrieren (0,2 µm)

2.2.4 3. Screenen der DNA-Phagen-Banken

Im 3. Screening wurden die Plasmidvektoren durch sogenanntes „*in vivo* excision“ aus der λ-Phagen-DNA herausgeschnitten. Der daraus resultierende Vektor mit dem genomischen DNA-Insert rezirkularisierte während dieses Vorgangs zu einem pBK-CMV-Plasmid, das durch seine Kanamycin-Resistenz selektiert werden konnte.

2.2.4.1 Umwandlung der Phagen in Bakterienklone durch „*in vivo* excision“

Plaques, die in der 2. Hybridisierung positive Signale aufwiesen, wurden mit einer kurzen Pasteurpipette aus den Agarplatten herausgetrennt und in 500 µl SM-Puffer (Kap. 2.2.3) resuspendiert. Nach Zugabe von 20 µl Chloroform wurde die Phagmid-Suspension gut gemischt und mindestens 2 h bei 4 °C gelagert. Die Lösung war bis zu 6 Monaten haltbar.

Für die „*in vivo* excision“ wurde *E. coli* XL1 blue MRF⁺ über Nacht angezogen (Kap. 2.1.6). Ein Teil dieser Kultur wurde 1:100 in 20 ml frischem LB-Medium, mit 10 mM MgSO₄ sowie 0,2% (w/v) Maltose verdünnt und bei 37 °C unter Schwenken inkubiert. Der Rest der ÜN-Kultur wurde für die Infektion mit der Phagmid-Lösung und dem Helferphagen ExAssist™ weiter verwendet. Hierfür wurde folgender Ansatz zusammengestellt:

Infektionsansatz:	XL1 blue MRF ⁺	100 µl
	Phagmid-Lösung	100 µl
	Helferphage ExAssist™	2 µl

Es folgte eine 30-minütige Inkubation bei 37 °C. Der gesamte Infektionsansatz wurde in 5 ml des gehaltvolleren 2YT-Mediums überführt und 4 h bei 37 °C geschüttelt. Nach einer weiteren 20-minütigen Inkubation bei 70 °C wurden die Bakterien bei 4.000 rpm (Sigma 4K 10, Rotor 11140) 5 min bei RT pelletiert. Von dem plasmidhaltigen Überstand wurden 1 bis 2 ml abgenommen, die bei 4 °C einige Tage haltbar waren. Von dieser Suspension wurden 200 µl entnommen, womit 200 µl verdünnte XL1-Blue MRF⁺ Kultur (s. o.) infiziert wurden. Dieser Ansatz wurde 30 min bei 37 °C inkubiert, bevor 2 x 200 µl davon auf LB-Agarplatten-Platten (Kap. 2.1.6) mit 50 µg/ ml Kanamycin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert wurden.

2YT-Medium:	10 g/ l NaCl
	10 g/ l Hefeextrakt
	16 g/ l Bacto-Trypton
	pH 7,5 einstellen
	autoklavieren

2.2.4.2 Herstellung der Hybridisierungsmembranen

Als Hybridisierungsmembranen wurden wie in der 2. Hybridisierung (Kap. 2.2.3) 6,5 x 6,5 cm² große Hybond N⁺-Membranen verwendet. Pro Klon wurden sieben verschiedene Kolonien von der LB-Kan-Agarplatte (Kap. 2.1.6) mit einem sterilen Zahnstocher abgenommen und nebeneinander auf der Membran ausgestrichen.

Dieselben Kolonien wurden zusätzlich in der gleichen Reihenfolge auf eine LB-Kan-Agarplatte übertragen. Pro Platte und Membran konnten sieben verschiedene Klone untereinander ausgestrichen werden. Die Membran wurde mit dem Kolonieausstrich nach unten auf eine weitere LB-Kan-Agarplatte gelegt und deren Lage auf der Platte markiert. Beide Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Platte mit dem Bakterienausstrich wurde bis zur Weiterverwendung bei 4 °C gelagert. Die Membran wurde von der zweiten Platte entfernt, und die darauf gewachsenen Bakterien wie im 1. und 2. Screening (Kap. 2.2.2.1.2) fixiert. Die trockenen Hybridisierungsmembranen wurden in Frischhaltefolie gewickelt und bei 4 °C gelagert.

2.2.4.3 Hybridisierung der Bakterienmembranen

Obwohl es sich hier um fixierte Bakterienklone und nicht um Bakteriophagen handelte, konnten die Membranen bei der Sondenherstellung und Hybridisierung genauso behandelt werden wie die Phagenmembranen des 1. und 2. Screenings. Sie konnten sogar in derselben Lösung, also mit den Membranen des 1. und 2. Screenings zusammen hybridisiert werden.

Von den Klonen, die in der 3. Hybridisierung positive Signale aufwiesen, wurden Stammkulturen, wie in Kap. 2.1.7 beschrieben, angelegt. Dabei wurden pro Klon je zwei der Abstriche auf der LB-Kan-Agarplatte (Kap. 2.1.6) in ÜN-Flüssigkulturen angesetzt.

2.2.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Klone, die nach dem dreifachen Screening positive Signale zeigten, wurden sequenziert. Dafür war es erforderlich, die Plasmid-DNA zu isolieren. Nachfolgend sind 2 verschiedene Methoden der Plasmid-DNA-Isolierung aufgeführt. Mit den beschriebenen Methoden konnten ausreichend reine DNA isoliert und zum Sequenzieren verwendet werden.

2.2.5.1 Verkürzte Mini-Plasmid-Präparation nach BIRNBOIM und DOLY (1979)

Die alkalische Lyse nach BIRNBOIM und DOLY (1979) zur Isolierung von kleinen Mengen Plasmid-DNA brachte auch in der verkürzten Fassung genügend reine DNA für mehrere Sequenzierungsansätze. Dabei wurden von den Stammkulturen, wie in Kap. 2.1.6 beschrieben, ÜN-Kulturen angesetzt. Hiervon wurden 2 ml abzentrifugiert (15.000 rpm, 1 min, RT, Hettich-Mikroliter, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen), der Überstand dekantiert und verworfen. Das Bakterienpellet wurde zur besseren Lyse für 1 h bei -20 °C eingefroren und nach dem Auftauen in 150 µl Resuspendierungspuffer P1 durch kräftiges Mischen resuspendiert. Es folgte eine 5-minütige Inkubation bei RT und die Zugabe von 150 µl Lysispuffer P2. Die Lösung wurde mehrfach vorsichtig geschwenkt. Durch Zugabe von 150 µl 3 M Kaliumacetat, pH 5,5 und erneutem vorsichtigen Schwenken wurde die Suspension neutralisiert. Zelltrümmer, chromosomale DNA und ausgefallene Proteine wurden abzentrifugiert (15.000 rpm, 10 min, RT). Der Überstand wurde mit 0,7 Volumen Isopropanol versetzt, zentrifugiert (s. o.), dekantiert und verworfen. Das Pellet wurde mit 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 30 µl TE-Puffer aufgenommen.

P1-Puffer: 50 mM Tris-HCl
 10 mM EDTA
 pH 8,0 einstellen
 autoklavieren
 100 µg/ ml RNase A

P2-Puffer: 200 mM NaOH
 1% (w/v) SDS
 steril filtrieren

TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl (pH 8,0)
 1 mM EDTA
 pH 7,5 einstellen
 autoklavieren

2.2.5.2 Minipräparation von Plasmid-DNA durch Affinitäts-Chromatographie

Zur Isolierung kleiner Mengen Plasmid-DNA aus den Stammkulturen wurde hauptsächlich die schnelle Methode durch Affinitäts-Chromatographie verwendet. Für die Minipräparation wurde die Methode des „QIAprep Spinprep-Kits“ der Firma Qiagen, (Hilden) modifiziert. Von den Stammkulturen wurden ÜN-Kulturen angesetzt (Kap. 2.1.6) und von der Zellsuspension 2 ml abzentrifugiert (15.000 rpm, 1 min, RT, Hettich-Mikroliter, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen). Die Pellets wurden bei -20 °C für 1 h gelagert. Nach dem Auftauen wurden die Pellets in 250 µl Resuspendierungspuffer P1 (Kap. 2.2.5.1) durch kräftiges Mischen resuspendiert. Die Lyse erfolgte nach Zugabe von 250 µl Lysispuffer P2 (Kap. 2.2.5.1) und vorsichtigem Wenden der Lösung. Durch Addition von 350 µl Neutralisierungspuffer N3 (keine Angaben des Herstellers, Guanidin-Hydrochlorid-haltig) wurde die Lösung unter leichtem Mischen neutralisiert. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation wurde der Überstand auf die Spin-Säulen aufgetragen und diese 1 min bei RT und 15.000 rpm abzentrifugiert. Die gebundene DNA wurde durch Zugabe von 750 µl Waschpuffer PE (keine Angaben des Herstellers, Guanidin-Hydrochlorid-haltig) und einer zweimaligen Zentrifugation (s. o.) gewaschen. Die reine DNA wurde durch Zugabe von 30 µl Elutionspuffer EB (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) 3 min lang gelöst und durch Zentrifugation (s. o.) in einem Reaktionsgefäß gesammelt. Die Lagerung der DNA-Lösung erfolgte bei -20 °C.

2.2.6 Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen

Die Konzentrationsbestimmung doppelsträngiger Plasmid-DNA wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm (Gene Quant, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) in Quarzglasküvetten durchgeführt. Als Leerwert diente 10 mM Tris-HCl, pH 8,5. Bei einer Schichtdicke von 1 cm gilt für eine $OD_{260\text{ nm}}$ von 1 eine Referenzkonzentration von 50 µg/ml dsDNA (DAVIS et al. 1980). Zudem wurde die Reinheit der DNA durch die Bestimmung des Verhältnisses von $OD_{260\text{ nm}}$ zu $OD_{280\text{ nm}}$ überprüft. Bei reinen DNA-Lösungen sollte dieses Verhältnis mindestens 1,8 betragen (SAMBROOK et al. 1989).

2.2.7 DNA-Sequenzierung nach SANGER et al. (1977)

Um die Mikrosatelliten identifizieren zu können, wurden die aus der genomischen DNA-Bank isolierten Klone sequenziert. Hierfür wurden zwei verschiedene Methoden verwendet, die beide auf dem Prinzip der DNA-Sequenzierung nach SANGER et al. (1977) beruhen. Als Primer-Ansatzstellen wurden Sequenzen kurz vor sowie hinter der MCS des pBK-CMV-Vektors gewählt, damit in die Insert-DNA von beiden Seiten hineinsequenziert werden konnte. Die Primer sind in Tab. 2.1. aufgeführt. Um möglichst lange Leseweiten in den unbekanntem Inserts zu erreichen, wurden spezifische pBK-CMV-Primer 40 bis 50 bp vor die MCS des Vektors gesetzt. Zur späteren Auftrennung auf Polyacrylamid-Gelen im ALFexpress™ DNA Sequencer wurden Cy5-markierte Primer verwendet.

Die in der Sequenzierungsreaktion entstandenen Fragmente verschiedener Länge wurden im automatischen ALFexpress™ DNA Sequencer aufgetrennt.

2.2.7.1 T7-Sequenzierungs-Reaktion

Die Sequenzierung der Mikrosatelliten-Klone mittels T7-Polymerase erfolgte mit Cy5-markierten Primern (Tab. 2.1) und wurde mit dem „Cy5™ Autoread™ Sequencing Kit“ (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die dsDNA sowie die Primer wurden dabei alkalisch denaturiert:

Denaturierungsansatz:	Plasmid-DNA (5 µg)	10,0 µl
	Cy5-markierter Primer (4 pmol)	2,0 µl
	10 M NaOH	1,5 µl

Dieser Ansatz wurde sofort mit einer zweiten Pipette gemischt, kurz anzentrifugiert (15.000 rpm, RT, Hettich-Mikroliter, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen) und 5 min bei 65 °C inkubiert (Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg).

Die Neutralisierung der Reaktion erfolgte gleichzeitig mit der Erstellung des Annealingansatzes:

Annealingansatz:	Denaturierungsansatz	13,5 µl
	1 M HCl	1,5 µl
	Annealing Puffer	2,0 µl

Diese Reaktion wurde 10 min bei 37 °C (Thermostat 5320, Eppendorf, Hamburg) und 10 min bei RT inkubiert. Während dieser Inkubationsphase wurden je 3 µl der 4 Terminationsmische A-Mix, C-Mix, G-Mix und T-Mix vorbereitet und bei 37 °C vorgewärmt.

Die Herstellung des Extensionsansatzes erfolgte durch Hinzufügen folgender Komponenten:

Extensionsansatz:	Annealingansatz	17,0 µl
	Extensionspuffer	1,0 µl
	DMSO	3,5 µl
	T7-Polymerase (6 U)	2,0 µl

Von diesem Ansatz wurden 5,3 µl auf die 4 verschiedenen Terminationsmische gegeben, abzentrifugiert (s. o.) und 5 min bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von 8 µl Ladepuffer wurde die Reaktion gestoppt. Bis zur Auftrennung der Sequenzierungsfragmente wurden diese bei 4 °C gelagert.

Annealing-Puffer: Keine Angaben des Herstellers
enthält MgCl₂

Extensionspuffer: Keine Angaben des Herstellers
enthält DTT

A-, C-, G- und T-Mix: Keine Angaben des Herstellers
enthalten neben den dNTPs 7-deaza-dGTP und je ein ddNTP

deionisiertes Formamid:	100 ml Formamid 1 g Dowex mixed bed 50 W x 8 (H ⁺)/ 1 x 8 (OH ⁻) (1:1) (Ionenaustauscher) 1 h bei 4 °C rühren durch Faltenfilter 5951/2 geben portioniert bei -20 °C lagern
Ladepuffer:	5 mg Dextranblau in 1 ml deionisiertem Formamid

2.2.7.2 „Cycle-Sequencing“-Reaktion

Mikrosatelliten bilden aufgrund ihrer Motiv-Wiederholungen häufig schwer auflösbare Sekundärstrukturen sog. „Loops“. Dies ist besonders bei dem CT-Motiv der Fall. Hier kommt es in der T7-Sequenzierung oft zum vorzeitigen Kettenabbruch, so daß die Sequenz nur sehr kurz zu lesen ist. Sekundärstrukturen können durch höhere Temperaturen besser aufgelöst werden; die T7-Polymerase hat jedoch bei 37 °C ihr Aktivitätsoptimum. Dagegen arbeitet die hitzestabile Thermo Sequenase (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) bei höheren Temperaturen, wobei diese Exonuklease-freie DNA-Polymerase genau wie die T7 DNA-Polymerase uniforme Sequenzbanden-Muster produziert (TABOR und RICHARDSON 1997). Die Kombination des gleichmäßigen Einbaus der dNTPs und der Erhöhung der Reaktionstemperatur machen es möglich, die Sequenzierung in Form von sich wiederholenden Zyklen aus Denaturierung, Annealing und Elongation (MURRAY 1989) durchzuführen.

Das „Cycle Sequencing“ wurde mit dem „Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP“ (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) durchgeführt. Dabei wurde in diesem Kit das dGTP durch 7-deaza-dGTP ausgetauscht, das bei der späteren Gelelektrophorese Kompressions-Artefakte ausschließen soll.

Für die Sequenzierungsreaktion wurden 5 µl Template-DNA der Mikrosatelliten-Klone (Kap 2.2.5) in 22 µl H₂O gelöst. Die 4 Reaktions-Mixe „A reagent“, „C reagent“,

„G reagent“ und „T reagent“ wurden auf Eis aufgetaut, gut gemischt und vor Benutzung abzentrifugiert.

Je Sequenzierungsansatz wurden 4 Teilansätze mit je einem Reaktions-Mix angesetzt. In diesen Reaktions-Mixen waren je ein ddNTP als Terminator in geringen Konzentrationen enthalten. Die Reaktionsansätze wurden auf Eis nach folgendem Schema zusammenpipettiert (Herstellerangaben):

Sequenzierungsansatz:	2 μ M Cy5-markierter Primer	1 μ l
	0,25 μ g/ μ l DNA	5 μ l
	<u>pro Ansatz je 1 Reaktions-Mix</u>	<u>2 μl</u>
	gesamt	8 μ l

Die Ansätze wurden mit 2 Tropfen Parafin-Öl überschichtet. Die Reaktion erfolgte im Thermocycler (PTC-100™ MJ Research, Inc, Biozym Diagnostic, Hessisch Oldendorf) bei:

1 x	Denaturierung:	95 °C	5 min
25 x	Denaturierung:	95 °C	30 sec
	Annealing:	55 °C	30 sec
	Elongation:	72 °C	30 sec
1 x		4 °C	∞

Zum Ansequenzieren von Klonen ist die Elongationsphase fakultativ. Um jedoch Leseweiten bis zu 1.000 bp erreichen zu können, sollte dieser Schritt genutzt werden. Die Lagerung der Sequenzierungsansätze erfolgte bei 4 °C.

2.2.7.3 Sequenzierungsgel

Zur Auftrennung der Sequenzierungsfragmente der Mikrosatelliten-Klone wurden ALFexpress™-Gelplatten mit einer Trennstrecke von 200 mm verwendet. Diese sowie die dazugehörigen Glas-Spacer wurden sorgfältig mit H₂O und mit 96%igem (v/v) Ethanol gesäubert. Die vordere Gelplatte wurde im Kammbereich mit 50 μ l Bindesilan-

Lösung eingerieben. Beide Gelplatten und die Spacer wurden staubfrei zusammengesetzt und der Kamm hineingesetzt.

Der Sequenzierungsgel-Mix wurde für 40 ml folgendermaßen zusammengesetzt:

Acrylamid/ Bisacrylamid (19:1)	7% (w/v)
Harnstoff	7 M
TBE	0,5x

Die Lösung wurde unter Vakuum (VacuGene Pump, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) durch 0,2 µm ME-Membranfilter (Ø 50 mm, Schleicher & Schuell, Dassel) filtriert und entgast. Nach Zugabe von 70 µl TEMED und 280 µl 10%igem (w/v) Ammoniumpersulfat (APS) wurde das Gel luftblasenfrei gegossen und mindestens 1 h auspolymerisiert.

Alternativ wurde das ReproGel™ Long Read von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) verwendet. Das ReproGel™ Long Read besteht aus 2 Lösungen: Lösung A enthält das Acrylamid/ Bisacrylamid und Lösung B den UV-Initiator in TBE gelöst. Dieses Gelsystem hat einmal den Vorteil, daß der Polymerisationsstart durch UV-Licht im Wellenlängenbereich 315 bis 400 nm (ReproSet, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) ausgelöst wird. Dadurch konnte der Gel-Mix in Ruhe gegossen und von Luftblasen befreit werden, bevor die Polymerisation gestartet wurde. Ein weiterer Vorteil lag darin, daß das Gel bereits innerhalb von 10 min auspolymerisiert und sofort verwendet werden konnte.

Die Proben wurden mit 8 µl Ladepuffer (1:1) versetzt (Kap. 2.2.7.1), für 5 min bei 95 °C denaturiert und auf Eis gelagert. Hiervon wurden 6 µl auf das Gel aufgetragen. Als Laufpuffer wurde 0,5x TBE verwendet. Die Gelelektrophorese erfolgte im „ALFexpress™ DNA Sequencer“ (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) für 750 min bei 1500 V, 38 mA, 25 W und 55 °C. Der Laser-Wert betrug mindestens 750. Alle 2 sec wurden Signale zum ALFwin™ Sequence Analyser V2.10.06 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala Schweden) übertragen. Diese Software diente auch zur Auswertung der Sequenzen, wobei nur der Startpunkt der auszuwertenden Sequenz und

die Lage der Lanes zueinander variiert wurden, nicht die Basen selbst, um unsichere Sequenzbereiche besser sichtbar zu erhalten.

10x TBE:	890 mM Tris-HCl 890 mM Borsäure 20 mM EDTA pH 8,4 einstellen nicht autoklavieren
Bindesilan-Lösung:	2 ml 96% (v/v) Ethanol 7,5 µl Bindesilan 0,5 ml 10% (v/v) Essigsäure
ReproGel Long Read Lösung A:	keine Angaben vom Hersteller enthält Acrylamid/ Bisacrylamid 14% (w/v)
ReproGel Long Read Lösung B:	keine Angaben vom Hersteller enthält: 1,5x TBE Denaturierungsagenzien UV-Initiator (Patent-Nr. SE 9604730-3)

2.2.8 Primerdesign mittels „Oligo® Primer Analysis Software Version 6 für Macintosh“

Konnten in den Klonen nach der Sequenzierung Mikrosatelliten identifiziert werden und besaßen diese genügend flankierende Sequenzen, so wurden vor und hinter den Mikrosatelliten-Motiven locuspezifische Primer für die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) gesetzt. Hierfür wurde die DNA-Sequenz als „.txt“-Datei in „Oligo® Primer Analysis Software Version 6 für Macintosh“ geladen.

Die Primer selbst sollten zwischen 71 und 350 bp auseinander liegen. Um optimale Primerpaare für die PCR-Reaktion zu erhalten, wurden folgende Parameter für die Suche eingegeben:

Anzahl Nukleotide:	optimal 21 bp, minimal 14 bp, maximal 25 bp
Minimal akzeptierte 3' ΔG :	-3,5 kcal/ mol
Maximale Länge akzeptabler Dimere:	3 bp
Spanne der 3' terminalen Stabilität:	von -5,5 bis -9,4 kcal/ mol
Bereich der Oligo-Tm-Werte:	von 49,2 bis 65,5 °C

Für alle weiteren Angaben wurden die „default“-Werte nicht verändert. Aus der erhaltenen Liste an Primerkombinationen wurden nur Primerpaare in eine Vorauswahl übernommen, deren G/C-Gehalt zwischen 30 und 60% lag. Die Primer wurden nach einem möglichst niedrigen G/C-Gehalt sortiert und davon die Primer mit den höchsten Ta-Werten in eine engere Auswahl genommen. Bei diesen Primern war darauf zu achten, daß

- der Wert des falschen Primeransatzes „false priming“ nicht über 200 lag, die Duplex-Bildung der einzelnen Primer („selfannealing“) und des vorderen und hinteren Primers zueinander besonders am 3'-Ende nur sehr geringe $-\Delta G$ Werte anzeigten.
- die „Haarnadelstruktur“-Bildung durch positive Bindungsenergie [kcal/ mol] verhindert wurde.
- die Temperatur, bei der es zu falschen Ansatzstellen der Primer kommen konnte („Missmatches“), unterhalb der verwendeten Annealing-Temperatur lag.
- in der graphischen Darstellung der internen Stabilität beider Primer das 3'-Ende die geringste Energie [$-\Delta G$] aufwies.
- in den vorgeschlagenen PCR-Bedingungen keine Warnungen z. B. durch zu hohe Unterschiede des Tm-Wertes zwischen Primer und Amplifikationsprodukt auftraten.

Gab es nach dieser Analyse noch mehrere Primerkombinationen zur Auswahl, so wurde der Primer mit der höchsten Annealing-Temperatur ausgewählt. Die Herstellung der Primer erfolgte bei der Firma Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg.

2.2.8.1 Design der „Ankerprimer“ mittels „Oligo® Primer Analysis Software Version 6 für Macintosh“

Einige Klone wiesen zwar Mikrosatelliten auf, doch waren diese zu dicht an den Klonierungsstellen. Bei diesen Klonen war eine flankierende Region zu kurz, so daß hier kein optimaler Primer gefunden werden konnte, oder die Region war bis auf die Restriktionsschnittstelle reduziert und fehlte damit völlig. Diese Mikrosatelliten sollten für die Entwicklung von Mikrosatelliten-Markern nicht verloren gehen. Hier wurde die Sequenz des Mikrosatelliten selbst als Primersequenz gewählt. Aufgrund der Wiederholungen kleiner Motive innerhalb des Mikrosatelliten kann es hier zu keinem locuspezifischen „Annealing“ der Primer kommen. Deswegen wurde die verbleibende Region am 5'-Ende des Mikrosatelliten, z. T. sogar nur noch die zum Klonieren verwendete Schnittstelle selbst (s. o.) als Verankerung des Primers am vorderen Ende des Mikrosatelliten verwendet.

Dieser „5'-Ankerprimer“ wurde in die „Oligo® Primer Analysis Software Version 6 für Macintosh“ als feststehender Primer eingegeben und nur in seiner Länge am 3'-Ende verändert, bis ein optimaler T_m-Wert entstand. Diese Länge konnte verändert werden, bis zu diesem Primer ein passender zweiter Primer gefunden wurde.

Da der „5'-Ankerprimer“ die Sequenz des Mikrosatelliten besitzt, hat er mehrere Möglichkeiten, im Genom anzusetzen. Damit trotzdem nur PCR-Fragmente entstehen, die nur an dem gewünschten Locus im Genom produziert werden, wurde dem „5'-Ankerprimer“ ein locuspezifischer Primer zugeordnet. Damit auch nur sequenzspezifische Produkte ausgewertet werden können, wurde auch nur der locuspezifische Primer Cy5-markiert, da auf einem ALFexpressTM nur Cy5-markierte Fragmente nachgewiesen werden können.

Diese locusspezifischen Primer wurden ebenfalls über die „Oligo® Primer Analysis Software Version 6 für Macintosh“ mit Hilfe der „Multiplex“-Funktion gesucht. Diese Suchfunktion wählt mehrere Primer aus, die sich leicht mit anderen Primern paaren lassen. Deswegen sind sie am ehesten für die Kopplung mit einem vorgegebenen „Ankerprimer“ geeignet. Die Suchkriterien entsprachen den in Kap. 2.2.8 beschriebenen Suchparametern für die Vorauswahl von Primern, da die „5′-Ankerprimer“ unter den gleichen PCR-Bedingungen wie diese Mikrosatellitenprimer funktionieren sollten. Die aufgezählten locusspezifischen Primer wurden in diesem Programm manuell als entgegengesetzter Primer zum „5′-Ankerprimer“ eingegeben und deren Kombinationsfähigkeit, wie in Kap. 2.2.8 beschrieben, untersucht. Zur Optimierung der Primerpaare konnte der „5′-Ankerprimer“, wie beim locusspezifischen Primer, am 3′-Ende verlängert oder verkürzt werden (s. o.).

2.2.9 Isolierung von Raps-Gesamt-DNA

Zur Isolierung der genomischen DNA aus gefrorenem Blattmaterial wurde das veränderte Extraktionsverfahren von ROGERS und BENDICH (1988) durchgeführt. Mit Hilfe dieser Methode konnten aus je 5 bis 10 g Blattmasse 16 bis 24 DNA-Proben mit guter Qualität gleichzeitig aufgearbeitet werden.

Diese DNA-Isolierungsmethode ist von UZUNOVA et al. (1995) beschrieben worden: Hierzu wurden 5 bis 10 g gefrorenes Blattmaterial unter Zugabe von flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver gemörsert und in 250 ml Erlenmeyerkolben überführt. Das Pulver wurde in 10 ml 65 °C warmen 2x CTAB-Puffer aufgenommen und nach Zugabe von 100 µl Proteinase K (10 mg/ ml, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim) 30 min bei 65 °C leicht geschüttelt. Der Lösung wurde nach dem Überführen in 50 ml Zentrifugenröhrchen das gleiche Volumen Chloroform/ Isoamylalkohol (24:1) zugegeben und nach kurzem Schütteln 10 min bei 4 °C und 12.000 rpm (Sigma 4K 10, Rotor 12.166) zentrifugiert. Die wäßrige Phase wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen gegeben und unter Zugabe des 1/ 10 Volumen 10% CTAB-Lösung und 1x Volumen Chloroform/ Isoamylalkohol (24:1), wie oben beschrieben, erneut zentrifugiert. Die wäßrige Phase wurde erneut in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und nach Zugabe von 1x Volumen 65 °C warmem CTAB-Präzipitationspuffer 10 min bei 20 °C

und 12.000 rpm (Sigma 4K 10, Rotor 12.166) zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert, verworfen, und das Pellet in 2 ml High-Salt-TE-Puffer unter vorsichtigem Schwenken bei 65 °C gelöst. Unter Zugabe von 2 Volumen kaltem 96% (v/v) Ethanol erfolgte eine Fällung bei -20 °C für ca. 16 h. Die DNA wurde 15 min bei RT und 15.000 rpm (Hettich Mikroliter Tischzentrifuge, Rotor 1394) pelletiert. Die Salzreste wurden durch Zugabe von 70%igem (v/v) Ethanol und 5-minütiger Zentrifugation bei RT und 15.000 rpm (Hettich Mikroliter Tischzentrifuge, Rotor 1394) entfernt. Das Pellet wurde im Exsikkator getrocknet und je nach Größe des Pellets in bis zu 1 ml 1x TE-Puffer aufgenommen. Zum vollständigen Lösen der DNA wurde diese mindestens eine Woche bei 4 °C gelagert.

2x CTAB-Puffer: 100 mM Tris-HCl (pH 8,0)
 20 mM EDTA
 1,4 M NaCl
 1% PVP 40.000
 2% CTAB
 durch Autoklavieren lösen

10% CTAB-Lösung: 10% CTAB
 0,7 M NaCl
 durch Autoklavieren lösen

CTAB-Präzitationspuffer: 50 mM Tris-HCl (pH 8,0)
 10 mM EDTA
 1% CTAB
 durch Autoklavieren lösen

High-Salt-TE-Puffer 10 mM Tris-HCl (pH 8,0)
 1 mM EDTA
 1 M NaCl
 autoklavieren

1x TE-Puffer 10 mM Tris-HCl (pH 8,0)
 1 mM EDTA
 autoklavieren

2.2.10 Gesamt-DNA-Konzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der Gesamt-DNA-Konzentration wurde das Meßverfahren mit dem TKO 100 Fluorometer (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco) gewählt. Hier bindet das Fluorochrom bis-Benzimidazol (DQ 201Hoechst 33258 Fluoreszenz Farbstoff, Sigma, St. Louis, USA) hochspezifisch an DNA. Der DNA-Farbstoff-Komplex kann im Fluorometer gemessen und dessen Konzentration durch Vergleich mit einer Referenz-DNA-Lösung bekannter Konzentration bestimmt werden. Da dieser Farbstoff kaum an RNA bindet, zeigen evtl. auftretende RNA-Verunreinigungen keine Auswirkung auf die DNA-Quantifizierung. Somit ermöglicht die fluorometrische Methode im Vergleich zu spektrophotometrischen Meßtechniken eine wesentlich präzisere DNA-Konzentrationsbestimmung.

Für die Durchführung der Messung wurde eine Farbstoff-Arbeitslösung 30 min vor Gebrauch hergestellt und dunkel gelagert. Zur Färbung des DNA-Standards wurden 8 µl Lambda DNA/*Eco130I*(*S_{ty}I*) (0,5 mg/ml) mit 12 µl 1x TNE-Puffer und 20 µl Farbstoff-Arbeitslösung versetzt. Der Ansatz wurde zentrifugiert und 20 min bei 4 °C dunkel gelagert. Zur Färbung der DNA-Proben wurden 3 µl der DNA zu 9 µl 1x TNE-Puffer gegeben und mit dem 1x Volumen Farbstoff-Arbeitslösung versetzt. Auch diese Proben wurden nach dem Anzentrifugieren 20 min bei 4 °C dunkel gelagert. Als Null-Abgleich wurde die Farbstoff-Arbeitslösung in 10 µl Kapillaren im TKO 100 Fluorometer (30 min Vorlauf) gemessen. Der Standard-Farbkomplex wurde zum Abgleich der Fluoreszenz von 400 bei einer Konzentration von 200 ng/ µl verwendet. Die Konzentration der DNA-Proben wurde ebenfalls in 10 µl Kapillaren gemessen.

10x TNE-Puffer: 12,1 g Tris-Base
3,7 g Na₂EDTA
58,4 g NaCl
ad 1 l H₂O
pH 7,4 einstellen
autoklavieren

Hoechst Farbstoff-Stocklösung (1 mg/ ml): 10 mg Hoechst Farbstoff H33258
10 ml H₂O
bei 4 °C im dunkeln lagern

Farbstoff-Arbeitslösung: 20 µg/ ml H33258): 20 µl Hoechst Farbstoff-Stocklösung
100 µl 10x TNE
880 µl H₂O
frisch ansetzen
bei RT dunkel lagern

2.2.11 Herstellung und Verwendung der internen Standards

Für die Analyse der Mikrosatelliten-Primerpaare in den untersuchten Brassicaceen mittels ALFexpress™ (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) wurde jeder PCR-Reaktion ein interner Standard zur Bestimmung der Fragmentgrößen hinzugefügt. Dieser Standard wurde aus 2 bis 3 PCR-Produkten definierter Größe zusammengestellt.

2.2.11.1 PCR zur Herstellung der internen Standards

Zur Herstellung der internen Standards wurden PCR-Produkte des 2.961 bp großen Vektors pBluescript II KS (+) (Kap. 2.1.5) erstellt. Dazu wurden die in Tab. 2.1 aufgezählten PCR-Primer in der folgenden Kombination verwendet (Tab. 2.4):

Tab. 2.4: Primerkombinationen zur Herstellung definierter PCR-Produkte.

Fragmentgröße der PCR-Produkte [bp]	Cy5-markierter	
	Primer	nicht markierter Primer
71	SKCy5	KS
115	SKCy5	T7
140	SKCy5	M13seq
192	M13seqC5	T3
227	M13seqC5	M13rev
250	M13seqC5	M250
300	M13seqC5	M300
325	T7SCy5	M350
350	M13seqC5	M350

Um möglichst hohe Mengen PCR-Produkte zu erhalten, wurde der 100 µl PCR-Ansatz wie folgt zusammengestellt:

dNTPs	0,2 mM
10x Puffer	1 x
Cy5-markierter Primer	0,2 µM
nicht markierter Primer	0,2 µM
Taq-DNA-Polymerase	2,5 U
<u>Phagmid-DNA</u>	<u>30 ng</u>
H ₂ O	ad 100 µl

Die Reaktion erfolgte im Thermocycler (TGradient, Biometra, Göttingen) bei:

1 x	94 °C	2 min
24 x	94 °C	1 min
	50 °C	1 min
	72 °C	1 min
1 x	72 °C	5 min
1 x	4 °C	∞

Bis zur gelelektrophoretischen Auftrennung wurden die PCR-Produkte bei 4 °C gelagert.

2.2.11.2 Zusammenstellung der internen Standards

Die internen Standards für die Gelelektrophorese der Mikrosatelliten-Primer wurden, wie ein Teil des Pflanzenmaterials (Kap. 2.1.9) in Abstimmung mit der Saatenunion (Leopoldshöhe) in folgender Zusammenstellung verwendet (Tab. 2.5):

Tab. 2.5: Zusammensetzung der internen Standards für PCR-Analysen.

Standard-Mix	71 bp	115 bp	140 bp	192 bp	227 bp	250 bp	300 bp	350 bp
Intern 1	X				X			
Intern 5	X			X				
Intern 8	X		X					
Intern 9		X	X					
Intern 11	X		X		X			
Intern 12	X	X			X			
Intern 13	X	X		X				
Intern 15	X		X	X				
Intern 16	X		X			X		
Intern 17	X		X				X	
M 350	X		X					X

Zur Erstellung der Standardkombinationen wurden von den Fragmentgrößen 71 bis 192 bp je 60 µl und von 227 bis 350 bp 80 µl PCR-Produkt verwendet und auf je 2 ml mit Ladepuffer (Kap. 2.2.7.1) aufgefüllt.

2.2.12 PCR-Analysen der Mikrosatelliten-Primerpaare

Zur Amplifikation der Mikrosatelliten enthaltenden Loci im Raps-Genom via PCR eigneten sich zwei verschiedene Ansätze am besten. Diese Reaktionsansätze unterschieden sich hauptsächlich in der Konzentration des $MgCl_2$ und im Einsatz von Dimethylsulfoxid (DMSO). Mg^{2+} -Ionen bilden zusammen mit den dNTPs einen löslichen Komplex, der für den dNTP-Einbau ausschlaggebend ist. Andererseits stimulieren sie die Polymeraseaktivität und erhöhen den T_m -Wert des DNA-Doppelstranges und dadurch die Bindung zwischen Primer und DNA-Template. Eine zu geringe Mg^{2+} -Konzentration kann die Ausbeute an PCR-Produkten vermindern, während eine zu hohe Konzentration die Bildung unspezifischer Produkte fördert. DMSO bewirkt eine Veränderung des T_m -wertes (BACHMANN et al. 1990). Durch dieses Detergenz konnte die Bildung von Sekundärstrukturen noch bei niedrigeren Temperaturen vermindert werden (WINSHIP 1989). Dieses Zusammenspiel zwischen Mg^{2+} -Ionen und DMSO mit einer zusätzlichen Variation zwischen drei verschiedenen Annealing-Temperaturen schafft mit geringem Aufwand optimale PCR-Bedingungen für alle eingesetzten Primerpaare.

Der Ansatz ohne DMSO mit einer höheren Konzentration an $MgCl_2$ wurde in Abstimmung des Resistenzlabors der Saatenunion (Leopoldshöhe) nach folgendem Schema zusammengestellt:

dNTPs	0,25 mM
$MgCl_2$	3,12 mM
PCR-Puffer	1x
Primer A Cy5 markiert	0,5 μ M
Primer B unmarkiert	0,5 μ M
Taq-DNA-Polymerase	1 U
<u>genomische DNA</u>	<u>30 ng</u>
H ₂ O	ad 20 μ l

In einem alternativen PCR-Ansatz wurde MgCl_2 in geringerer Konzentration eingesetzt, dafür aber der Reaktion 2% DMSO zugefügt:

dNTPs	0,2 mM
MgCl_2	1,5 mM
PCR-Puffer	1x
Primer A Cy5-markiert	0,5 μM
Primer B unmarkiert	0,5 μM
Taq-DNA-Polymerase	1 U
genomische DNA	25 ng
<u>DMSO</u>	<u>2%</u>
H_2O	ad 10 μl

Die PCR-Reaktion fand im Thermocycler PTC-100™ MJ Research, Inc. (Biozym Diagnostic, Hessisch Oldendorf) unter Verwendung von 2 Tropfen Öl oder im PCR-Gerät TGradient (Biometra, Göttingen) ohne Verwendung von Öl statt. Der TGradient hat den Vorteil, daß der Heizdeckel individuell programmierbar ist: Lag die Temperatur des Deckels um 10 °C höher als die höchste Temperatur während der PCR, so wurde die Bildung von Kondenswasser im Reaktionsgefäß verhindert. Der PCR-Ansatz mußte nicht durch Beschichten mit Öl eingeeengt werden.

Die Reaktion selbst erfolgte verändert nach KRESOVICH et al. (1995) in Form einer „Touchdown“-PCR: Nach einem anfänglichen Denaturierungsschritt bei 94 °C für 2 min folgten Zyklen mit je einer Denaturierung bei 94 °C, 1 min, dem Annealing bei 65 °C für 30 sec und der Elongation bei 72 °C für 45 sec. Die Annealing-Temperatur wurde alle 2 Zyklen um 1 Grad gesenkt, bis eine Temperatur von a) 58 °C, b) 55 °C oder c) 50 °C erreicht wurde. Danach folgten entsprechend der Temperaturen:

- 26 Zyklen mit einer Annealing-Temperatur von 58 °C,
- 20 Zyklen bei einer Annealing-Temperatur von 55 °C oder
- 10 Zyklen bei einer Annealing-Temperatur von 50 °C.

In allen drei Varianten wurde eine Gesamt-Zyklenzahl von 40 erreicht. Danach folgte ein Endloszyklus bei 4 °C.

2.2.13 Auftrennung der PCR-Produkte

Die Auftrennung der PCR-Produkte zur Analyse der Mikrosatelliten-Primerpaare wurde auf 2 unterschiedliche Weisen durchgeführt: Zum einen konnte die Auftrennung auf hochprozentigen „Low Melting“ Agarosegelen erfolgen. Eine Alternative bietet hier die Auftrennung der PCR-Produkte auf Polyacrylamid-Gelen. In dieser Arbeit wurde diese Trennungsmethode mit Hilfe des Sequenzierautomaten ALFexpress™ (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) durchgeführt.

2.2.13.1 Auftrennung der PCR-Produkte mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der PCR-Produkte wurden Gelplatten mit einer Trennstrecke von 80 mm (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) verwendet. Diese „kurzen Gele“ wurden, wie in Kap. 2.2.7.3 für Sequenzierungsgele beschrieben, behandelt. Als Gelmatrix wurden 20 ml eines 8%igen (w/v) Acrylamid/ Bisacrylamid-Gels verwendet, filtriert, entgast und auspolymerisiert.

Die PCR-Amplifikationsreaktionen wurden 1:1 mit dem jeweiligen internen Standard (Tab.2.5) versetzt, vor dem Auftragen auf das Gel 5 min bei 95 °C denaturiert und auf Eis mindestens 2 min gelagert. Von diesem Gemisch wurden je nach Amplifikationsstärke 0,5 bis 8 µl aufgetragen.

Die Fragmente wurden im automatischen DNA Sequenzierer ALFexpress™ unter folgenden Laufbedingungen aufgetrennt:

Laufbedingungen:	Laufpuffer:	0,5x TBE (Kap. 2.2.7.3)
	Spannung:	1.500 V
	Stromstärke:	60 mA
	Leistung:	25 W
	Temperatur:	55 °C

Die Laufzeit variierte zwischen 75 min bei kleinen Amplifikationsprodukten bis 250 bp und 120 min bei Trennstrecken bis 350 bp. Alle 2 sec wurden Signale zum „ALFwin™ Fragment Analyser 1.00.32“ (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala Schweden) übertragen. Die Auswertung der Gelläufe und die Bestimmung der PCR-Fragmentgrößen erfolgte mit Hilfe der Software „AlleleLinks Version 1.01“ (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala Schweden) unter Zuhilfenahme der internen Standards als definierte Größen.

2.2.13.2 Auftrennung der PCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese

Eine weitere Methode zur Auftrennung von PCR-Fragmenten bot die Agarose-Gelelektrophorese. Da die PCR-Amplifikationsprodukte der Mikrosatelliten-Primerpaare jedoch nur kleine Fragmente von 71 bis 350 bp ergaben, mußte eine hohe Konzentration an hochwertiger Agarose gewählt werden. Die Gelelektrophorese erfolgte mit 5%iger (w/v) „Low Melting“ MetaPhor™ Agarose (Biozym, Hess. Oldendorf). Diese hohe Konzentration an Agarose setzte eine besondere Behandlung bei der Herstellung der Gele voraus, damit die Agarose gleichmäßig gelöst werden konnte: Hierzu wurden 5% (w/v) Agarose in 125 ml kaltem 1x TBE (Kap. 2.2.7.3) unter starkem Rühren zugegeben und gemischt. Die Agarose-Lösung wurde ausgewogen und mehrfach vorsichtig in der Mikrowelle erhitzt. Dazwischen wurde die Gellösung ca. 30 sec stehengelassen, damit die Luftblasen entweichen konnten und auf einem Magnetrührer in einem Becherglas mit ca. 70 °C warmem Wasser kräftig gemischt, um ein gleichmäßiges Schmelzen der Agarose zu gewährleisten. Nach dem vollständigen Lösen der Agarose wurde das Gemisch erneut gewogen, der Gewichtsverlust durch 65 °C warmes H₂O aufgefüllt und erneut gemischt. Das Gel wurde in einen mit Gewebepband abgedichteten Gelschlitten (15 cm) mit einem schmalen Kamm blasenfrei

gegossen, ausgehärtet und für mindestens 30 min bei 4 °C gelagert. Die Gelsubstanz konnte 3 bis 4 mal wieder aufgeschmolzen und neu verwendet werden.

Als interner Standard fanden die in Tab. 2.5 beschriebenen PCR-Fragmente mit definierter Größe Verwendung. Hier wurde jedoch keine Kombination von 2 bis 3 Fragmenten gewählt, sondern nur eine dieser Fragmentgrößen verwendet, da diese in hohen Konzentrationen eingesetzt werden mußten, um sie auf dem Gel erkennen zu können. Dabei durfte das Volumen der Geltaschen nicht überschritten werden und es konnte ein Aufkonzentrieren der internen Standards durch Fällung mit Alkohol vermieden werden. Der interne Standard wurde mit der konzentrierten 6x Farblösung für PCR-Produkte 1:1 gemischt. Dieser Ladepuffer wurde unverdünnt zum Beschweren der DNA beim Auftragen auf das Gel verwendet.

Dafür wurden die PCR-Produkte der Mikrosatelliten-Primer im Verhältnis 2:1 mit dem Ladepuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Der Gellauf erfolgte in 1x TBE, bei 135 V in einer ECONO-Submarine Gel Unit SGE-030 Gelkammer von C.B.S. Scientific CO (DelMar, CA, USA) für mind. 10 h. Für eine optimale Auftrennung der PCR-Fragmente wurde 1x TBE als Laufpuffer verwendet, weil dieser durch die Bindung des Bors an die Polysaccharide der Agarose eine stabilere Gelmatrix bildet und damit die PCR-Amplifikationsprodukte schärfer auftrennt.

6x Farblösung für PCR-Produkte: 0,25% (w/v) Bromphenolblau
40% (w/v) Saccharose
mit 10 M NaOH bis zur Blaufärbung titrieren

Ladepuffer: 6x Farblösung für PCR-Produkte 1:1 mit einem internen Standard versetzt

2.2.13.3 Ethidiumbromid-Färbung und Dokumentation von Agarosegelen

Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurde die DNA im Agarosegel in einer Ethidiumbromid-Lösung (1 µg/ml H₂O) für je 15 bis 30 min angefärbt und anschließend im Wasserbad entfärbt. Die bei UV-Bestrahlung ($\lambda = 254$ nm, UV-

Transilluminator, Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen) fluoreszierenden DNA-Banden wurden mit einer Polaroid-Kamera (Polaroid MP-4 Land Camera, Polaroid, Cambridge, USA, Polaroidfilm 667, Intas Göttingen) fotografiert oder mit einer Videokamera (Mitsubishi, Model P78E, Intas, Göttingen) mit Hilfe der Gel-Dokumentationsanlage „System Duo“ (Intas, Göttingen) aufgenommen.

2.2.14 Datenanalyse

2.2.14.1 Auswertung der Sequenz-Reaktionen mittels ALFexpress™

Die Sequenzen wurden direkt nach der gelelektrophoretischen Auftrennung durch das Programm ALFwin™ Sequence Analyser V2.10.06 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) automatisch prozessiert, wobei eine vom Programm vorgeschlagene Sequenz berechnet wurde. Diese Basenabfolge zeigte jedoch nicht in allen Fällen die optimale Prozessierung, da Unregelmäßigkeiten im Gel nicht mit berücksichtigt wurden. Hier konnte durch manuelles Verschieben der einzelnen Linien (je eine der vier Basen repräsentierend) in der Region des Primers alle vier Signale übereinander geschoben werden.

Zusätzlich benötigt der Rechner für die optimale Berechnung der Sequenzabfolge eine korrekte Auftrennung der einzelnen Basen am Startpunkt, um die Abstände der nachfolgenden Basen bestimmen zu können. Der Startpunkt kann jedoch von dem Signal, das den freien Fluoreszenzfarbstoff repräsentiert, verdeckt werden, oder eventuell auftretende Sekundärstrukturen können die Lesbarkeit der Sequenz herabsetzen. In diesen Fällen kann der Rechner die nachfolgende Sequenz nur unzureichend bestimmen. Aus diesem Grund kann der Startpunkt der Prozessierung der Basen manuell weiter nach hinten in einen besser aufgelösten Bereich verlegt werden. Die Rohdaten wurden bei der manuellen Prozessierung nicht verändert.

2.2.14.2 Auswertung der Muster der PCR-Amplifikationsprodukte nach der Gelelektrophorese

Die Auswertung der Amplifikationsprodukte wurde mit dem Programm für Windows-Rechner AlleleLinks Version 1.01 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) durchgeführt. Mit jeder auf das Gel aufgetragenen PCR-Reaktion wurde ein interner Standard mit aufgetragen. Zur Berechnung der Größen der Amplifikationsprodukte (in bp) wurden den Signalen des internen Standards ihre jeweiligen Fragmentgrößen zugeordnet. Durch die Eingabe der maximalen und minimalen Locus-Größen (in bp) wurden die einzelnen Signale, die in diesem Bereich lagen, den Allelgrößen zugewiesen.

2.2.14.3 Ermittlung genetischer Distanzen

Zur Berechnung der genetischen Distanzen wurden zunächst für jeden polymorphen Locus die Genotypen der untersuchten Sorten bestimmt. Jedes Allel wurde getrennt ausgewertet. Die An- und Abwesenheit der Amplifikationsprodukte wurde als 1/0 Werte dokumentiert mit ‚1‘ für vorhanden und ‚0‘ für abwesend. War ein Genotyp nicht eindeutig erkennbar wurde dieser mit ‚9‘ vermerkt.

Basierend auf der mit 1/0-Werten erstellten Matrix wurde für alle möglichen Paarvergleiche über die untersuchten Genotypen die genetische Distanz (GD) nach dem von NEI und LI (1979) für RFLP-Untersuchungen empfohlenen Koeffizienten für codominante Marker von DICE (1945) geschätzt:

$$GD_{\text{Dice}} = 1 - \frac{2a}{2a + (b + c)}$$

a = Anzahl der Banden, die bei beiden Genotypen vorhanden sind
b = Anzahl der Banden, die nur Genotyp A hat
c = Anzahl der Banden, die nur Genotyp B hat

Die Kalkulation zur Schätzung der genetischen Distanzen und Durchführung der Clusteranalyse erfolgte mit dem Programm NTSYS/pc Version 1.80, das von Exeter Software (New York, USA) entwickelt wurde.

2.2.14.4 Genetische Kartierung

Um die SSR-Marker in die RFLP-Kopplungskarte (UZUNOVA et al. 1995) integrieren zu können, wurden zunächst für jeden SSR-Marker die Genotypen der 151 DH-Linien der Kartierungspopulation bestimmt. Wenn ein Signal keine Allelität zu einem anderen zeigte („Nullallel“), wurde sie als dominanter Marker ausgewertet. Für die ermittelten SSR-Marker wurden die Genotypen der 151 DH-Linien als Zeichencode in einem mit dem Programm MAPMAKER/EXP. Version 3.0b (Whitehead Institute of Biomedical Research, Cambridge, USA) kompatiblen Format in einer Rohdaten-Datei gespeichert. Individuen, die das Markerallel des Elters ‚Mansholt‘ zeigten, wurden mit ‚M‘ und Individuen, die das Markerallel von ‚Samourai‘ geerbt hatten, mit ‚S‘ bezeichnet. Nicht klar erkennbare Genotypen wurden als fehlende Daten (,-‘) weggelassen.

Die Zuordnung der SSR-Marker in die bereits bestehende RFLP-Karte erfolgte mit Hilfe des Programms MAPMAKER/EXP. Version 3.0b (Whitehead Institute of Biomedical Research, Cambridge, USA) (LANDER et al. 1987) unter dem Betriebssystem Unix. Das Programm kann in der Version nur mit den genetischen Modellen für F₂- und Rückkreuzungspopulationen rechnen. Da die erwarteten Spaltungsverhältnisse für Marker in einer aus Mikrosporen der F₁ hergestellten DH-Population und in einer Rückkreuzung identisch sind, wurde die DH-Population als Rückkreuzung behandelt. Für die Zuordnung von Markern zu einer Kopplungsgruppe mit Hilfe der „near“-Funktion wurden folgende Kriterien zugrundegelegt: a) maximale Rekombinationsfrequenz von 0,4 zwischen zwei Markern und b) minimale log-Likelihood Differenz (LOD-Wert) von 4,0 zwischen Kopplung und freier Spaltung. Der LOD-Wert ist ein Maß für die Wahrscheinlichkeit der Existenz einer Kopplung. Er ist definiert als der Logarithmus aus dem Verhältnis der Wahrscheinlichkeiten (Likelihoods), die man unter den Annahmen erhält, daß 2 Marker gekoppelt sind bzw. daß sie frei spalten (MORTON 1955). Ein LOD-Wert von 4,0 bedeutet, daß die

Wahrscheinlichkeit der Kopplung zwischen 2 Markern 10^4 -fach größer ist als die Wahrscheinlichkeit für eine freie Spaltung.

Um die wahrscheinlichste Position eines neuen SSR-Markers in einer Kopplungsgruppe zu bestimmen, wurde anschließend eine Multipunktanalyse mit Hilfe der „try“-Funktion durchgeführt. Hierbei wurde die Anordnung einer größeren Anzahl von Markern simultan bestimmt, indem die Rekombinationswerte zwischen diesen Markern gleichzeitig berücksichtigt werden. Nach dem manuellen Integrieren der SSR-Marker in die Kopplungsgruppen wurden die Rekombinationswerte zwischen den Markern bestimmt und nach der Transformationsfunktion von KOSAMBI (1944) in lineare cM-Einheiten umgerechnet. Anhand der neuen Markerordnung wurden die vorhandenen Doppelcrossover bestimmt, denn Fehler in der Bestimmung der Genotypen der Marker können leicht Doppelcrossover vortäuschen. Alle entsprechenden Genotypen wurden anhand der Gel-Analysen überprüft. Bei fraglichen Genotypen wurden die PCR-Reaktionen wiederholt und die Werte entweder korrigiert oder aus dem Datensatz entfernt.

3. Ergebnisse

3.1 Isolation der Mikrosatelliten aus genomischen Raps-DNA-Phagen-Banken

Zur Identifizierung von Mikrosatelliten-Motiven im Raps-Genom wurden 2 genomische DNA-Phagen-Banken auf GA- und CA-Motive mit Hilfe von poly(dA-dG)-poly(dC-dT)- und poly(dA-dC)-poly(dG-dT)-Sonden vollständig durchsucht. Die DNA-Banken wurden aus den beiden Winterraps-Sorten ‚Mansholt‘ und ‚Samourai‘ angelegt. Dabei wurde die aus ‚Mansholt‘ isolierte DNA nur mit einem Restriktionsenzym und zwar mit *Sau3A I* geschnitten, während die DNA aus ‚Samourai‘ neben der Restriktion mit *Sau3A I* zusätzlich mit dem methylierungssensitiven Restriktionsenzym *PstI* verdaut wurde, um methylierte repetitive Sequenzen abzureichern.

Zum Durchsuchen der DNA-Bank wurden die SSR-Sonden getrennt markiert, jedoch in der Hybridisierung zusammen verwendet (Doppelhybridisierung). Um den Erfolg der Sondenmarkierung zu überprüfen, wurden Dot Blots mit unmarkierter Sonde mit in die Hybridisierungslösung gegeben. Auffällig bei der Hybridisierung war, daß die Dot Blots mit dem poly-CA-Motiv grundsätzlich ein stärkeres Signal zeigten als die mit dem poly-GA-Motiv (Abb. 3.1). Bei der Auswertung der Hybridisierungen wurden daher sowohl schwache, als auch starke Signale als positiv bewertet.

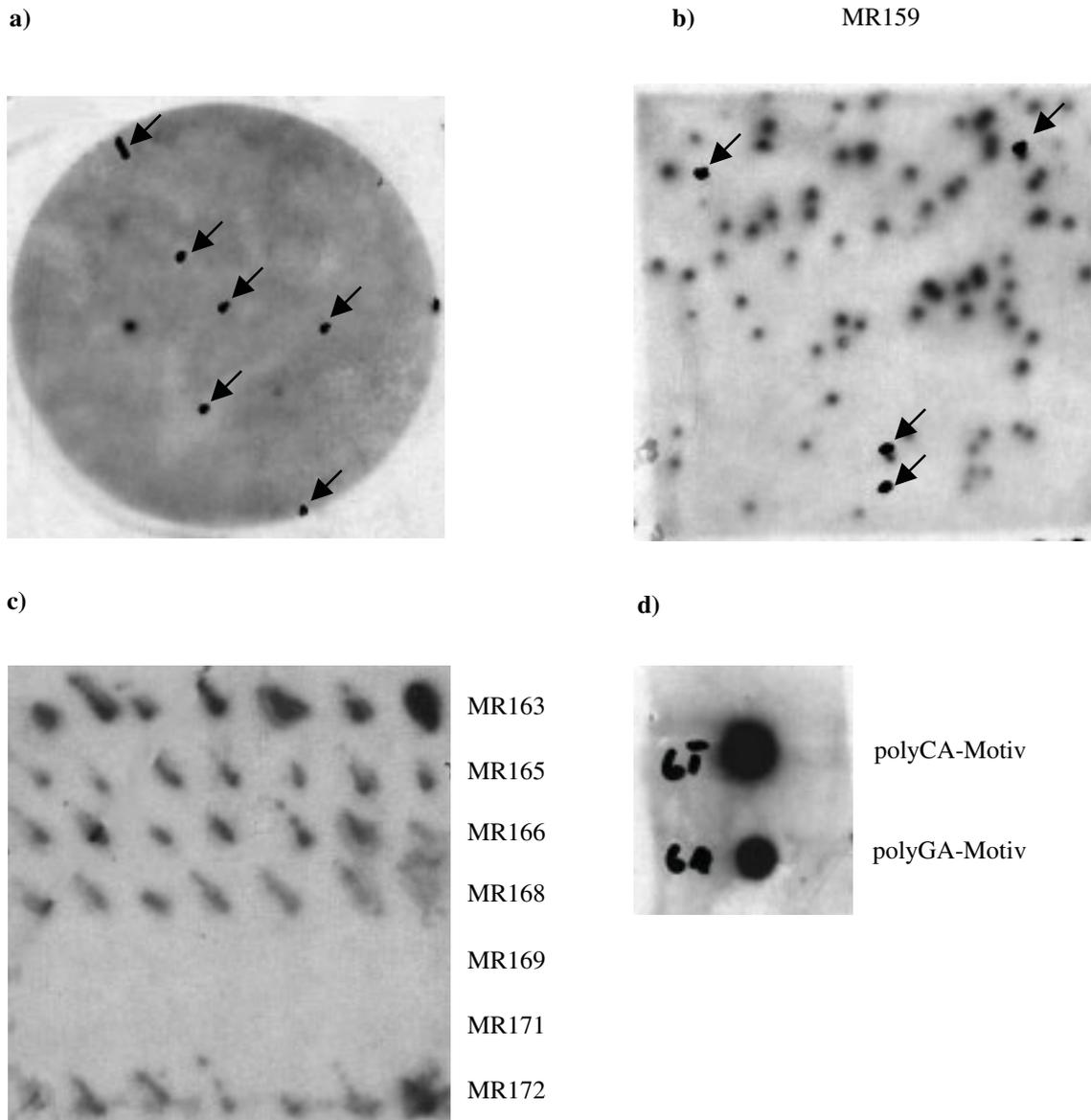


Abb. 3.1: Beispiele aus der ersten bis dritten Hybridisierung: a) Membran aus der ersten Hybridisierung, b) Membran aus der zweiten Hybridisierung, c) Hybridisierungssignale der Klone aus der dritten Hybridisierung, d) Hybridisierung von Dot Blots mit unmarkierter Sonde. (Die Pfeile auf den Membranen a und b geben die Kennzeichnung der Lage der Membranen auf den Agarplatten an.)

In der ersten Hybridisierung wurden 429 positive Plaques identifiziert (Tab. 3.1), die von den Agarplatten isoliert und auf neuen Platten vereinzelt wurden. Bei der zweiten Hybridisierung mit denselben Sonden zeigten 286 Phagen positive Signale. Die Phagen wurden durch „*in vivo* Excision“ in Plasmid-Klone umgewandelt und ein drittes Mal

mit den poly-GA- und poly-GT-Sonden hybridisiert. Hierbei zeigten 162 Klone positive Signale, von denen jeweils 2 Bakterienstammkulturen (A und B) angelegt wurden.

Tab. 3.1: Übersicht über die dreifache Hybridisierung der genomischen DNA-Phagen-Banken mit poly-GA- und poly-CA-Sonden.

vollständige DNA-Banken	60.000 Phagen-Klone
positive Signale nach der ersten Hybridisierung	429 Phagen-Klone
positive Signale nach der zweiten Hybridisierung	286 Phagen-Klone
positive Signale nach der dritten Hybridisierung	162 Plasmid-Klone

3.2 Identifizierung der Mikrosatelliten

Alle nach der dritten Hybridisierung 162 positiven Klone wurden von beiden Seiten sequenziert. Von diesen wiesen 24 keinen Mikrosatelliten auf. In 3 Klonen konnte nur das Plasmid ohne Insert identifiziert werden. Daraus ergaben sich 27 sog. „falsch positive Klone“. Weiterhin enthielten 3 repetitive Klone Sequenzen, die zwar GA- bzw. CA-reich waren, aber keine Mikrosatelliten repräsentierten, 3 Sequenzen kamen doppelt vor. Damit waren 33 Klone nicht verwendbar. Insgesamt konnten in 129 Klonen Mikrosatelliten identifiziert werden (Tab. 3.2).

Tab. 3.2: Zusammenfassung der Sequenzierung positiver SSR-Klone.

Sequenzierte Klone	162
Klone ohne Mikrosatelliten	24
Klone ohne Insert	3
Klone mit repetitiven Sequenzen	3
Klone doppelt vorhanden	3
Klone mit SSR(s)	129

Von diesen 129 SSR-Klonen wiesen mehrere 2 bis 4 Mikrosatelliten auf: In 14 Klonen konnten 2 SSRs, in je einem Klon 3 und 4 SSRs identifiziert werden. Diese lagen fast ausschließlich mit SSRs, bestehend aus GA-Motiven, zusammen. Die restlichen 113 Klone enthielten jeweils einen Mikrosatelliten. Es wurden damit in der Sequenzierung insgesamt 148 Mikrosatelliten identifiziert (Tab. 3.3).

Tab. 3.3: Übersicht über die Anzahl der identifizierten Mikrosatelliten.

Anzahl SSRs/ Klon	Anzahl Klone	Summe SSRs
1	113	113
2	14	28
3	1	3
4	1	4
1 – 4	129	148

Aus der Raps-Linie ‚Samourai‘ stammten 24 Mikrosatelliten, die restlichen 124 SSRs wurden aus der ‚Mansholt‘ DNA-Bank isoliert.

3.3 Charakterisierung der identifizierten Mikrosatelliten

Alle 148 identifizierten Mikrosatelliten sind in Anhang C näher beschrieben. Als perfekte SSRs konnten 71 identifiziert werden, während 59 Mikrosatelliten Unterbrechungen in der Motivabfolge zeigten und damit imperfekt waren. Bei 8 SSRs wurden 2 oder 3 verschiedene Motivwiederholungen gefunden. Hier handelt es sich um zusammengesetzte Mikrosatelliten (Tab. 3.4).

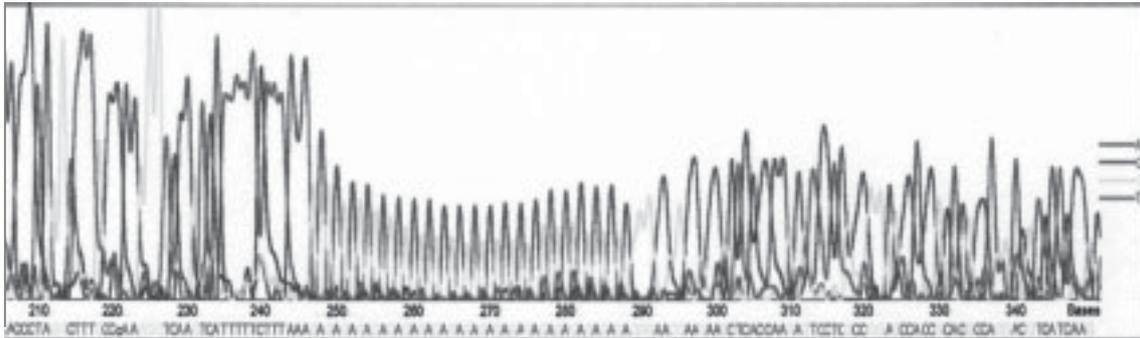
SSRs gelten als schwierig zu sequenzieren: Sie neigen dazu, während des Sequenzierungsvorgangs schwer auflösbare Sekundärstrukturen zu bilden. In diesen Bereichen ist die Sequenz gerade innerhalb des Mikrosatelliten nicht lesbar. Daher konnte von 10 SSRs der Mikrosatellitentypus nicht bestimmt werden. Diese wurden jedoch – sofern es die flankierenden Regionen der Mikrosatelliten zuließen – weiter untersucht.

Tab. 3.4: Übersicht über die Charakterisierung der Mikrosatelliten-Typen.

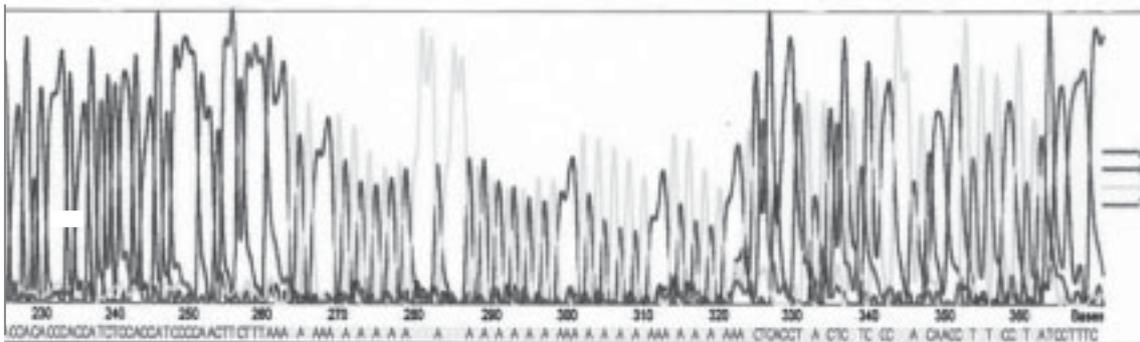
SSR-Typ	Anzahl SSRs
perfekt	71
imperfekt	59
zusammengesetzt	8
nicht bestimmbar	10
gesamt	148

Beispiele für einen perfekten, imperfekten und zusammengesetzten Mikrosatelliten sind in Abb. 3.2 aufgeführt. Der Klon MR185 enthielt das perfekte SSR-Motiv $(AG)_{22}$ und MR179 besaß den imperfekten Mikrosatelliten $(AG)_6GGAGGG(AG)_6AA(AG)_5AA(AG)_4$. Hier war das GA-Motiv durch die Basen Adenin (A) oder Guanin (G) unterbrochen. MR42 besaß dagegen einen Mikrosatelliten, der sich aus den Motiven AC und AT zusammensetzte, die direkt aufeinander folgten. Dabei war das AT-Motiv durch Einzelbasen unterbrochen (Sequenz des SSRs MR42: $(AC)_{14}(AT)_7CTC(AT)_5$). Dieser SSR ist ein Beispiel für einen zusammengesetzten imperfekten Mikrosatelliten.

a) perfekter SSR: MR185



b) imperfekter SSR: MR179



c) zusammengesetzter SSR: MR42

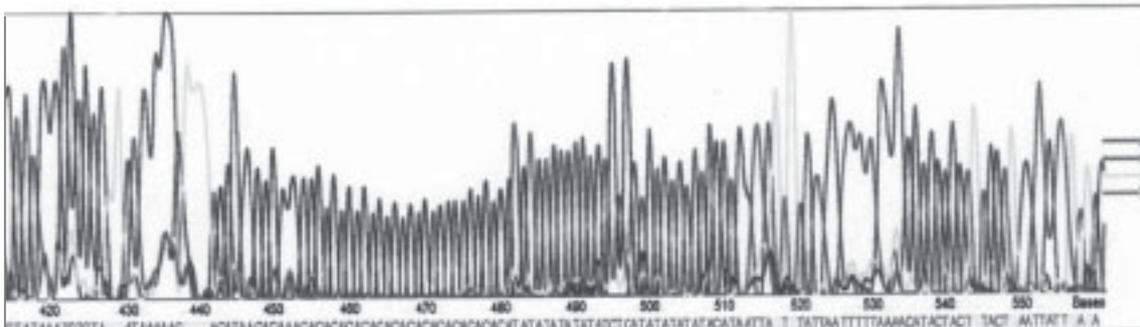


Abb. 3.2: Beispiele für verschiedene SSR-Typen: a) perfekter Mikrosatellit MR185 mit der Sequenz $(AG)_{22}$, b) imperfekter Mikrosatellit MR179 mit der Sequenz $(AG)_6GGAGGG(AG)_6AA(AG)_5AA(AG)_4$, c) zusammengesetzter Mikrosatellit MR42 mit $(AC)_{14}(AT)_7CTC(AT)_5$, einem perfekten und imperfekten Motiv.

Bei der Untersuchung der SSR-Motive wurden innerhalb der Gruppe der einfachen Mikrosatelliten 112 GA- und 18 CA- Motive identifiziert. Von den zusammengesetzten SSRs enthielten weitere 3 GA-Motive und 4 CA-Motive. Es wurden damit insgesamt 115 GA- und 22 CA-Motive entdeckt, wodurch sich ein Verhältnis von 5,2 : 1 (GA : CA) ergab.

Obwohl nur diese beiden Motive beim Durchsuchen der DNA-Banken verwendet wurden, konnten auch SSRs mit anderen Motiven identifiziert werden. Hierzu gehören 5 TA-Motive, 2 T-Monomere sowie 2 ATA- und ein CTT- als Dreier-Motive. Ein weiteres Dreier-Repeat (TTG) ist mit einem TG-Repeat verbunden und gehört damit zu einem der zusammengesetzten SSRs. Als weiterer zusammengesetzter Mikrosatellit konnte sogar das Sechser-Motiv AGAAAG zusammen mit einem GA-Motiv nachgewiesen werden. Weitere zusammengesetzte Motive waren immer mit einem GA- oder CA-Repeat gekoppelt. Es handelt sich dabei um die AC/AT-Kombination (4x) und um die Zusammensetzung GA/CA/TGG sowie GA/TA/CA (je 1x). Eine Zusammenfassung aller SSR-Motive ist in Tab. 3.5 wiedergegeben.

Tab. 3.5: Übersicht über Art und Anzahl der SSR-Motive.

SSR-Typ	SSR-Motiv	Anzahl SSRs
einfach	GA	112
	CA	18
	TA	5
	T	2
	ATA	2
	CTT	1
	<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>	
zusammengesetzt	AC/AT	4
	TTG/TG	1
	AGAAAG/GA	1
	GA/TA/CA	1
	GA/CA/TGG	1
gesamt		148

Die Anzahl an Motiv-Wiederholungen lag bei den perfekten Mikrosatelliten zwischen 7 und 49. Bei den imperfekten SSRs waren 3 bis 77 Wiederholungen erkennbar, wobei jedoch auch einzelne Motive durch eingestreute Basen abgetrennt sein konnten (Beispiel: MR 123 mit $\mathbf{GAG(GA)}_{17}$), oder ein einfaches Motiv inmitten der Unterbrechung liegen konnte (Beispiel: MR199.4 mit $(\mathbf{TG})_2\mathbf{AGTGTA(TG)}_{12}$, Anhang C).

Abb. 3.3 gibt eine Übersicht über die Anzahl der Repeat-Wiederholungen von 3 bis 77 pro SSR und deren Häufigkeit wieder. Im Durchschnitt wurden die Motive 20,2 x pro SSR wiederholt. Aus der Abbildung wird deutlich, daß Motivwiederholungen von 3 bis 30 Repeats pro SSR mehr als 4/5 aller Fälle ausmachten. Wiederholungen eines Motives von mehr als 30 mal traten dagegen nur noch vereinzelt auf.

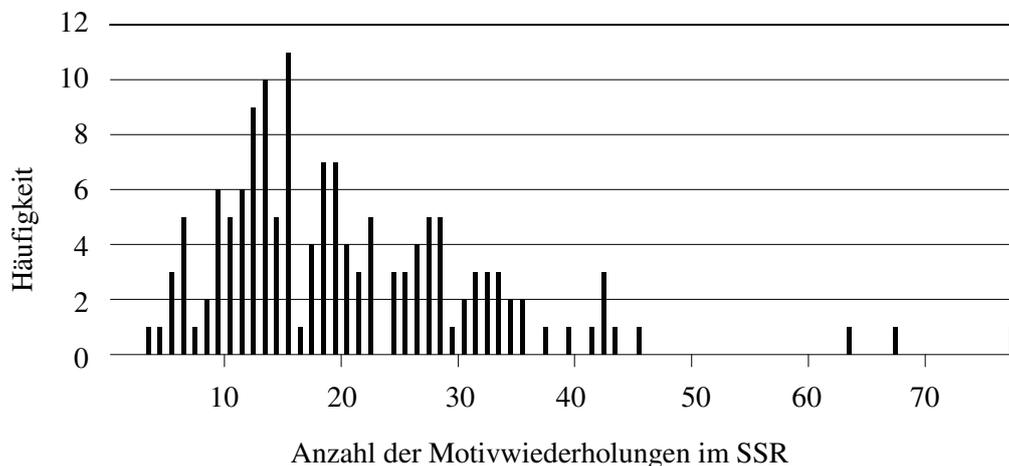


Abb. 3.3: Vergleich der Anzahl an Motiv-Wiederholungen und ihrer Häufigkeit.

Die imperfekten SSRs setzten sich z. T. aus mehreren Einzelmotiven zusammen oder wurden durch einzelne Basen unterbrochen, wodurch sich die Gesamtlänge des Mikrosatelliten vergrößerte. Sie variierte zwischen 8 und 250 bp mit einem Mittelwert von 50,4 bp. Dabei wiesen über 4/5 (entsprechend 84%) der SSRs Größen zwischen 18 und 71 bp auf. Außerhalb dieses Bereichs traten nur vereinzelt größere oder kleinere Mikrosatelliten auf (Anhang C).

3.4 Primerdesign an den flankierenden Mikrosatelliten-Regionen

Es waren nicht alle 148 Mikrosatelliten zum Design von Primerpaaren geeignet. In 8 SSR-Klonen waren extreme Sekundärstrukturen nicht nur im SSR, sondern auch in einer der flankierenden Regionen vorhanden, so daß hier kein Primer gesetzt werden konnte. Der SSR MR 97.2 war mit 4 GA-Wiederholungen zu klein, um als Mikrosatellit verwendet zu werden und der SSR MR 138 mit über 250 bp zu groß, um diesen mit geeigneten Primern flankieren zu können. Da in der PCR lediglich Fragmente bis zu 340 bp entstehen sollten, standen bei MR138 für die Primer nur noch ca. 90 bp zur Verfügung. Diese reichten nicht aus, um ein optimales Primerpaar finden zu können. Bei 6 weiteren SSR-Klonen waren die berechneten optimalen Annealing-Temperaturen (T_a) zu niedrig oder zu hoch. Auch diese Klone konnten nicht zum Primerdesign genutzt werden. In 3 Klonen lagen je 2 Mikrosatelliten so dicht zusammen, daß diese durch ein Primerpaar umschlossen wurden. Insgesamt konnten 129 SSR-Primerpaare gesetzt werden (Tab. 3.6).

Tab. 3.6: Übersicht über die Verwendbarkeit der SSRs zum Primerdesign.

identifizierte SSRs	148
nicht verwendbar aufgrund von Sekundärstrukturen	8
nicht verwendbar aufgrund der Annealing-Temperatur (T_a)	6
nicht verwendbar aufgrund ihrer Größe	2
2 SSRs von einem Primerpaar umschlossen	3
Anzahl hergestellter Primerpaare	129

Wie aus Anhang C zu erkennen ist, wurden bei 10 Klonen (MR8, MR83, MR133, MR140, MR157, MR163, MR191, MR203, MD2 und MD19) für je 2 SSRs Primerpaare angefertigt, und in dem Klon MR199 sogar 3 SSRs mit Primerpaaren versehen. Diese Klone enthielten jeweils mehrere Mikrosatelliten, die zu weit auseinander lagen, um in einem gemeinsamen PCR-Produkt untersucht zu werden. Da möglichst viele polymorphe SSRs identifiziert werden sollten, wurden alle verwendbaren Mikrosatelliten mit Primerpaaren versehen.

Unter den verwendeten Mikrosatelliten befanden sich 13 SSRs, die zu dicht an der Restriktionsschnittstelle des Klon saßen. Damit war eine der flankierenden Regionen stark verkürzt, oder sie fehlte bis auf die Schnittstelle selbst. Als Beispiel sei hier MD92 angeführt (Abb. 3.4). Der Mikrosatellit lag direkt am Ende des sequenzierten Klon. Die SAU3A I- Schnittstelle (GATC) ragte sogar in den SSR hinein.

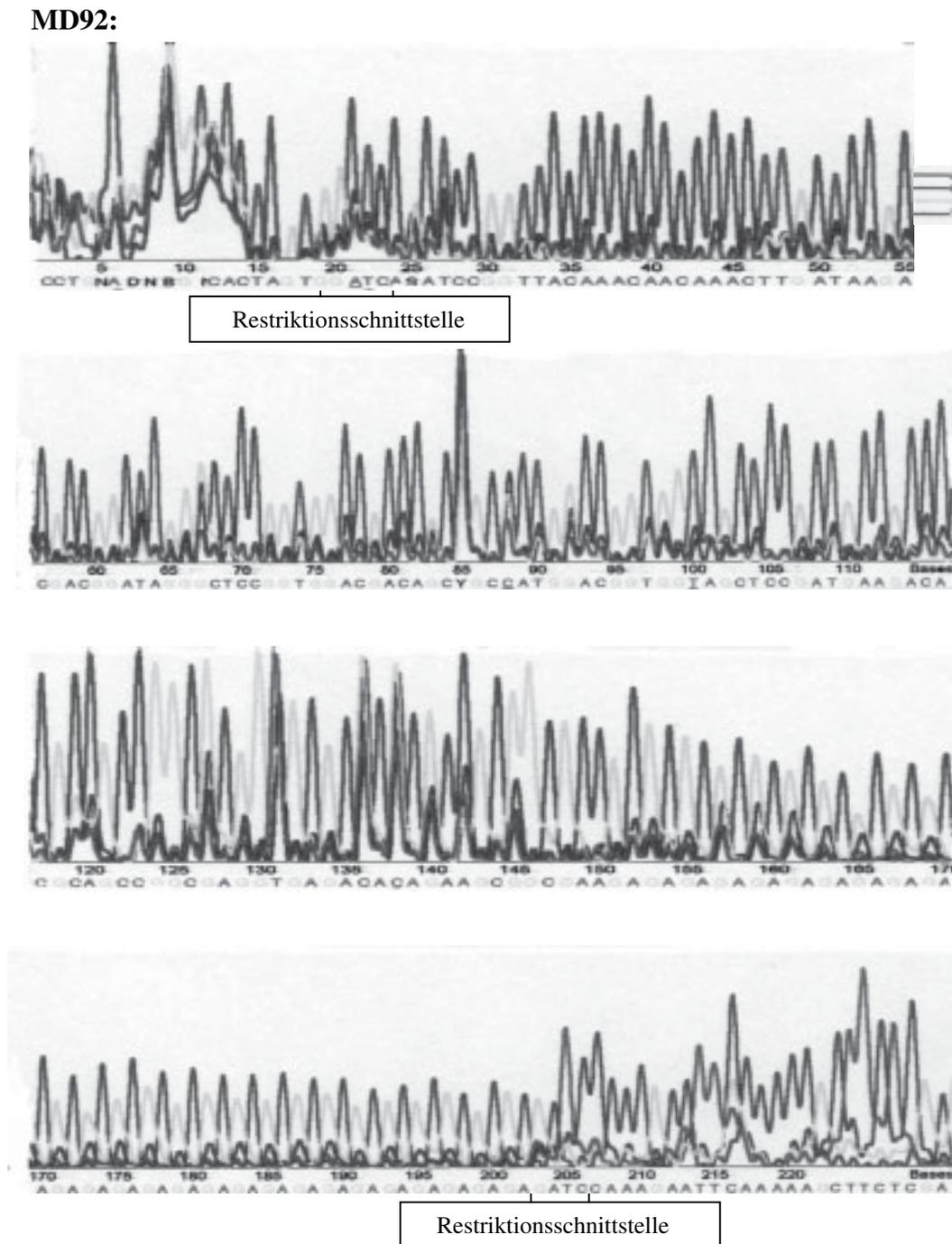


Abb. 3.4: Die Sequenz des Klones MD92 mit dem Mikrosatelliten direkt vor der hinteren Restriktionsschnittstelle SAU3A I (GATC).

Bei SSR-Klonen mit fehlenden oder zu kurzen flankierenden Regionen konnten unter Standardbedingungen keine Primerpaare gesetzt werden, was die Ausbeute an verwendbaren SSRs um 10% gemindert hätte. Für diese Mikrosatelliten wurden „5‘verankerte Primer“, sog. „Ankerprimer“, zusammen mit einem locuspezifischen Primer gesetzt. In Tab. 3.7 werden 6 „Ankerprimer“ als Beispiele gezeigt. Diese Primerpaare wurden dem Gastwissenschaftler Prof. Dr. J. P. Varghese für weitere Untersuchungen zur Verfügung gestellt und veröffentlicht (VARGHESE et al. 2000). Sie werden daher bei der späteren Charakterisierung der SSR-Marker nicht weiter berücksichtigt.

Tab. 3.7: Beispiele des Designs von „Ankerprimern“.

Klon	Locusspez. Primer	„Ankerprimer“	Ankerbasen
MR146	ATGCGATGAACAGAGTTACAG	ACTCAGAGGGAGAGAGAGAGAGA	4
MR157	ATTACGAAAATGCCCTGACGA	AAA ACTCTCTCTCTCTCTCTCTC	4
MR174	TAACGATGGTGCTCTAAGTGT	<u>GAT</u> CAGAGAGAGAGAGAGAGAGA	4
MD38	TAATAGAACACGTTGGAGCTTA	AAATGT GAGAGAGAGAGAGAGAGAG	6
MD40	AGGGCGTAGGTGAACAAT	<u>ATCT</u> GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG	4
MD46	TCTCTCCCTCGCTCTCATAATAA	TTGGAT TCTCTCTCTCTCTCTCTC	5

(**fettgedruckt**: SSR-Sequenz, unterstrichen: Basen aus der Schnittstelle)

Ein weiteres Beispiel des Einsatzes von „Ankerprimern“ bietet der Mikrosatellit MR163.2. Es handelt sich hierbei um einen imperfekten Mikrosatelliten (Anhang C). Dieser SSR erwies sich mit 204 bp als zu groß, so daß in seinen flankierenden Regionen keine optimalen Primer gefunden werden konnten, die Fragmentgrößen bis 340 bp produziert hätten. Deswegen wurde ein Primer in den imperfekten SSR direkt hineingesetzt und durch spezifische Basen, die die GA-Motive im Mikrosatelliten unterbrachen, „verankert“.

3.5 Prüfung der Mikrosatelliten-Primerpaare und Optimierung der Amplifikationsbedingungen

In den DH-Linien 5.1 und 5.2 („Mansholt“) sowie 11.4 („Samourai“) und deren F₁ wurden 123 SSR-Primerpaare auf ihre Verwendbarkeit in der PCR überprüft. Dabei wurde der Einfachheit halber zuerst eine „Touch down“ PCR mit einer End-Annealingtemperatur (End-Ta) von 55 °C durchgeführt (Kap. 2.2.12). Dies sollte die uniforme Verwendung der Primer in der PCR erleichtern. Entstanden hierbei jedoch zu viele unspezifische Produkte, wurde die End-Ta auf 58 °C erhöht. Konnten bei einer „Touch down“ PCR bei 55 °C keine PCR-Produkte identifiziert werden, so wurde die End-Ta auf 50 °C erniedrigt. Auf diese Weise wurde eine einheitliche Basis mit einer „Touch down“ PCR bis 55 °C End-Ta und den zwei Varianten in der PCR bis 58 °C bzw. 50 °C End-Ta geschaffen.

Das gleiche gilt für die Verwendung der internen Standards bei der Auftrennung, der durch die PCR entstandenen Fragmente im Polyacrylamidgel. Als universeller interner Standard diente I17, da dieser Standard mit seinen Fragmentgrößen (71 bp, 140 bp und 300 bp) das breite Spektrum der PCR-Produkte am besten abgedeckte. Lagen die PCR-Produkte der SSR-Primerpaare zu dicht an einer dieser Längenmarker, oder überschritten sie sich sogar mit diesen, so wurde ein anderer Standard gewählt (Kap. 2.2.11.2).

Die 10 SSR-Primerpaare MR8.2, MR100, MR128, MR179, MR185, MR191.2, MR199.2, MR203.1, MR210 und MD92 ergaben keine reproduzierbaren PCR-Produkte. Diese Primerpaare wurden in 2 unterschiedlichen PCR-Methoden mit den 3 verschiedenen Ta-Endwerten (Kap. 2.2.12) untersucht. Sie konnten für die nachfolgenden Untersuchungen also nicht weiter verwendet werden. Dabei sind die 4 SSR-Primer MR8.2, MR191.2, MR199.2 und MR203.1 jedoch aus je einem Klon entwickelt worden, in dem ein weiterer Mikrosatellit mit Primern flankiert wurde. Diese Primerpaare ergaben in der PCR reproduzierbare Fragmente, so daß dieser Locus im Raps-Genom für weitere Analysen nicht verloren ging. MR8.1 und MR8.2 sind als Beispiel in Abb. 3.5 aufgeführt. Während die PCR mit dem Primerpaar MR8.2 sehr viele, nicht reproduzierbare Banden zeigte, die nicht ausgewertet werden konnten, wurde mit dem

Primerpaar MR8.1 ein einheitliches Fragment amplifiziert. Diese beiden SSRs liegen 255 bp auseinander. Der Verlust an nicht verwendbaren SSR-Loci durch nicht funktionsfähige Primerpaare geht damit auf 6 (entsprechend 7,4%) zurück.

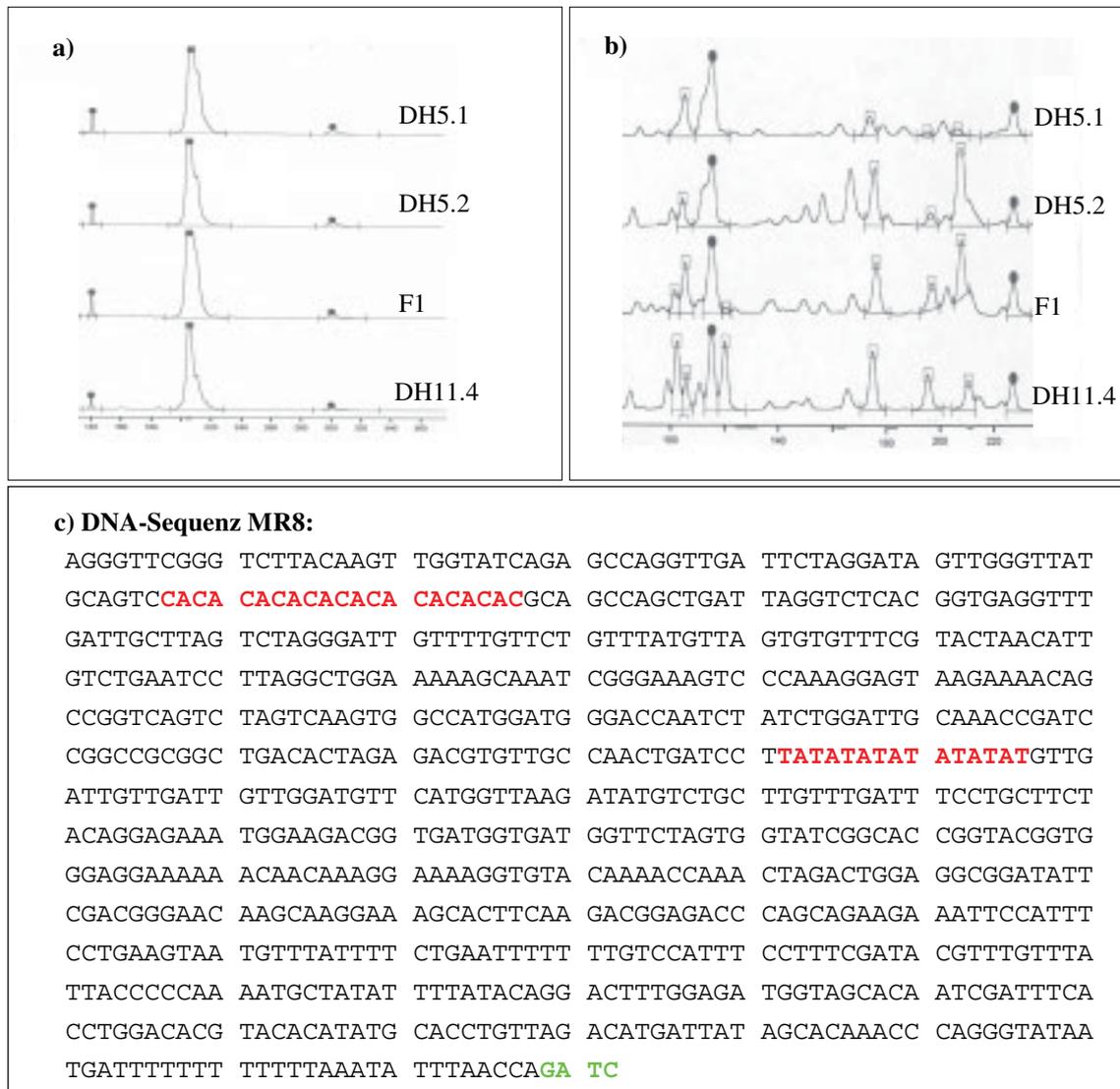


Abb. 3.5: Fragmentanalysen der SSR-Primerpaare MR8.1 und MR8.2 sowie die dazugehörige DNA-Sequenz mit beiden Mikrosatelliten: a) MR8.1 zeigte ein Amplifikationsprodukt bei 202 bp (rote Quadrate, ausgefüllt: PCR-Produkte, grüne Punkte: Standard 140 bp und 300 bp), b) Amplifikation mit dem SSR-Primerpaar MR8.2 zeigte viele Banden, die einander nicht zugeordnet werden konnten (rote Quadrate, nicht ausgefüllt: PCR-Produkte, grüne Punkte: Standard 115 bp und 227 bp). c) Die zu beiden SSRs gehörende Sequenz MR8 mit den Mikrosatelliten MR8.1 und MR8.2 (rot: SSRs, grün: Restriktionsschnittstelle SAU3A I).

Insgesamt zeigten 113 SSR-Primerpaare reproduzierbare Amplifikationsprodukte und konnten in den weiteren Analysen verwendet werden.

3.6 Analyse der Mikrosatelliten-Primerpaare im Raps

Alle funktionsfähigen 113 Mikrosatelliten-Primerpaare wurden in einem Sortiment aus 19 Winterraps- und 19 Sommerraps-Genotypen (Anhang B) weiter charakterisiert. Als Kontroll-DNA wurde die DNA der DH-Eltern-Linien der Kartierungspopulation ‚Mansholt‘ und ‚Samourai‘ sowie deren F₁ mit untersucht. Diese wurden bereits in der Optimierung der PCR-Bedingungen verwendet und dienten hier als zusätzlicher Abgleich für die Bestimmung der Allelgrößen der amplifizierten Loci.

3.6.1 Verhalten der Loci im Raps

Von den im Raps untersuchten SSR-Primerpaaren amplifizierte nur knapp die Hälfte ein einzelnes PCR-Produkt pro Genotyp (Tab. 3.8). Mit den restlichen Primerpaaren wurden 2 bis 7 Amplifikationsprodukte pro Genotyp nachgewiesen, wobei Muster mit mehr als 3 Banden mit 4,4% nur gelegentlich auftraten. In den nachfolgenden Untersuchungen wurden alle 199 identifizierten PCR-Amplifikationsprodukte getrennt analysiert und als eigenständige Loci betrachtet.

Tab. 3.8: Übersicht über die 199 Loci aus den 113 SSR-Primerpaaren.

Amplifikationsprodukte/ SSR-Primerpaar	Anzahl Primer	Summe der Amplifikationsprodukte
1	52	52
2	44	88
3	12	36
4	4	16
5	0	0
6	0	0
7	1	7
gesamt	113	199

Von den 199 Amplifikationsprodukten oder Loci wiesen 76 (38,2%) in den verschiedenen Genotypen keine Unterschiede in ihrer Fragmentgröße auf (Tab. 3.9). Diese Loci waren damit in den untersuchten Rapsorten monomorph. Dagegen zeigten 123 Loci (61,8%) Größenunterschiede in ihren Amplifikationsprodukten und waren damit polymorph. Auffällig war hier, daß 64 dieser polymorphen SSR-Marker (52,0%) in einer oder mehreren Rapsorten kein PCR-Produkt zeigten. Diese wurden als „Nullallele“ bezeichnet und mit in die Berechnungen einbezogen, obwohl die Ursache der Fehlamplifikationen nicht bekannt und damit auch die Anzahl der Veränderungen in diesem Allel nicht sichtbar war. Wenn ein polymorpher Locus in dem zu analysierenden Sortiment neben einem uniformen Amplifikationsprodukt – oder Allel – auch ein „Nullallel“ aufwies, so konnte dieser Locus nur als dominanter Marker Verwendung finden. Hiervon wurden im Raps 34 (17,1%) identifiziert. Besaß ein Locus mehrere Allele und ein „Nullallel“, so wurde er als vorwiegend codominanter Marker der Gruppe der codominanten Marker zugewiesen.

Tab. 3.9: Übersicht über das Verhalten der Loci in den 38 Raps-Linien.

Verhalten der Loci im Raps	Anzahl Loci	Anteil in %
monomorph	76	38,2
polymorph codominant	89	44,7
polymorph dominant	34	17,1
gesamt	199	100

Die Anzahl der Allele in den identifizierten 123 polymorphen Loci lag einschließlich der „Nullallele“ zwischen 2 und 11 pro Locus mit einem Mittel von 3,7. Die mittlere Allelfrequenz betrug 0,27. Die Verteilung der Allele ist in Tab. 3.10 angegeben. Hieraus wird ersichtlich, daß über 1/3 der polymorphen Loci (41,5%) beim Raps in nur 2 Allelen vorlagen. Mehr als 1/2 der Loci besaßen 3 – 7 Allele. Mit nur 5,6% kamen 8 oder mehr Allele pro Locus im Raps vor.

Tab. 3.10: Anzahl Allele der polymorphen SSR-Loci in den 38 Raps-Linien.

Anzahl Allele/ polymorpher Locus	Anzahl Loci	Summe der Allele	Anteil in %
2	51	102	41,5
3	21	63	17,1
4	16	64	13,0
5	13	65	10,6
6	9	54	7,3
7	6	42	4,9
8	3	24	2,4
9	1	9	0,8
10	1	10	0,8
11	2	22	1,6
2 – 11	123	455	100,0

Die Allel-Größen der polymorph vererbten Loci variierten dabei zwischen 2 und 42 bp mit einem Mittelwert von 7,9 bp. Allel-Differenzen von mehr als 2 bp waren in nur 36 Loci vorhanden. Loci, die multiple Allelie aufwiesen, zeigten fast ausschließlich Größenunterschiede in 2 bp-Schritten (Anhang D).

3.6.2 Verhalten der SSR-Primerpaare im Raps

Um die Verwendbarkeit der Mikrosatelliten zur Entwicklung von molekularen Markern in Bezug auf ihren Typus, ihre Motive oder ihre Länge zu untersuchen, wurden die Mikrosatelliten-Primerpaare selbst auf ihr Verhalten im Raps hin überprüft. Hierfür wurden alle Amplifikationsprodukte, die mit Hilfe eines Primerpaares identifiziert wurden, gemeinsam ausgewertet. Damit konnte geprüft werden, ob das Primerpaar polymorphe oder ausschließlich monomorphe Loci nachwies.

Aus Tab. 3.11 wird ersichtlich, daß der Anteil an Mikrosatelliten-Primerpaaren, die nur monomorphe Loci amplifizieren, mit 33 nur 29,2% der 113 SSR-Primerpaare ausmachte. Dagegen amplifizieren 80 SSR-Primerpaare (entsprechenden 70,8%) im Raps polymorphe Loci, wobei der Anteil an SSR-Primerpaaren, die nur einen oder mehrere dominante Marker amplifizieren, im Raps unter 10% lag.

Tab. 3.11: Analyse der 113 SSR-Primerpaare in den 38 Raps-Linien.

Analyse der Primerpaare im Raps	Anzahl Primerpaare	Anteil in %
monomorph	33	29,2
polymorph codominant	69	61,1
polymorph dominant	11	9,7
gesamt	113	100

Die SSR-Primerpaare wurden zunächst im Hinblick auf den Typus des Mikrosatelliten, für den sie entwickelt worden waren, untersucht. Hier konnten jedoch 6 SSR-Primerpaare nicht zugeordnet werden, da der Typ des zugeordneten Mikrosatelliten aufgrund von Sekundärstrukturen in der Mikrosatelliten-Sequenz (Kap. 3.3) nicht bestimmt werden konnte. Bei 2 SSR-Primerpaaren waren je ein perfekter und ein imperfekter Mikrosatellit vereinigt. Hinzu kamen 2 Primerpaare für zusammengesetzte SSRs. Der Rest der Primerpaare verteilte sich, wie in Tab. 3.12 gezeigt, auf 53,1% perfekte und 38,1% imperfekte SSRs.

Tab. 3.12: Aufteilung der untersuchten Mikrosatelliten-Primerpaare anhand des zugehörigen SSR-Typus.

SSR-Typ	Anzahl Primerpaare	Anteil in %
perfekt	60	53,1
imperfekt	43	38,1
enthält perfekte und imperfekte Motive	2	1,8
zusammengesetzt	2	1,8
nicht bestimmbar	6	5,3
Summe	113	100,1*

(*Rundungsfehler)

Die Primerpaare für perfekte und imperfekte Mikrosatelliten wurden auf ihr polymorphes Verhalten im Raps hin weiter untersucht. Wie aus Tab. 3.13 zu ersehen, zeigten jeweils mehr als 2/3 der Primerpaare Polymorphismen für perfekte wie imperfekte

SSRs. Dieses Ergebnis spiegelt sich bei der Betrachtung der gesamten im Raps untersuchten Mikrosatelliten-Loci wieder. Zusammen waren ca. 1/3 der SSRs monomorph, und ca. 2/3 der Mikrosatelliten wiesen unterschiedliche Allele auf.

Tab. 3.13: Aufteilung der SSR-Primerpaare anhand des Typus des zugehörigen Mikrosatelliten und dessen Verhalten in den 38 Raps-Linien.

SSR-Typ	monomorph		polymorph		Summe	
	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
perfekt	16	26,7	44	73,3	60	100
imperfekt	14	32,6	29	67,4	43	100
sonstige	3	---*	7	---*	10	---*
Summe	33	29,2	80	70,8	113	100

(---*: nicht berechnet)

Die wenigen Primerpaare für SSRs mit zusammengesetzten Motiven wurden bei dieser Betrachtung nicht berücksichtigt, da aufgrund der geringen Zahl dieses Typus keine klaren Schlußfolgerungen gezogen werden konnten.

Das Verhältnis 1/3 monomorpher SSR-Loci zu 2/3 polymorpher SSR-Loci spiegelt sich auch in der Auswertung der SSR-Motive wieder (Tab. 3.14), wobei GA-Motive einen höheren Anteil polymorpher Mikrosatelliten aufwiesen als CA-Motive. Hier muß jedoch angemerkt werden, daß die Gesamtzahl der auswertbaren CA-Motive mit 16 sehr gering war, so daß das Verhalten eines SSRs bereits 6,25% ausmachte.

Tab. 3.14: Aufteilung der SSR-Motive und deren Verhalten in den 38 Raps-Linien.

Motiv	monomorph		polymorph		Summe	
	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
GA	23	26,1	65	73,9	88	100
CA	6	37,5	10	62,5	16	100
TA	2	---	0	---	2	---
CTT	0	---	0	---	1	---
ATA	0	---	1	---	1	---
T	0	---	2	---	2	---
zusammengesetzt	2	---	0	---	3	---
gesamt	33	29,2	80	70,8	113	100

(---*: nicht berechnet)

Die im Raps untersuchten Mikrosatelliten wurden ebenfalls nach der Größe ihrer SSRs sortiert. SSR-Größe und polymorphes Verhalten der SSR-Primer wurden gegenübergestellt. Wie in Tab. 3.15 zu sehen, war das Auftreten polymorpher SSRs in allen Größen zufällig verteilt. Es konnte keine Abhängigkeit des Polymorphismus zur Größe gefunden werden.

Tab. 3.15: Aufteilung der SSR-Größen und deren Verhalten in den 38 Raps-Linien.

SSR-Primerpaar	SSR-Größe	mon.	pol.	SSR-Primerpaar	SSR-Größe	mon.	pol.	SSR-Primerpaar	SSR-Größe	mon.	pol.
MR163.2	204		x	MR136	56	x		MR92	30		x
MR5	132	x		MR148	56		x	MR113	30		x
MR191.1	129	x		MR153	56		x	MD41	30		x
MR231	112	x		MR107	54	x		MD52	30	x	
MR54	110		x	MR37	52		x	MD56	30	x	
MR229	ca. 110		x	MR216	52		x	MR168	29	x	
MR3	105		x	MR18	46		x	MR199.1	29		x
MR102	92		x	MR21	46		x	MR25	28	x	
MR213	92		x	MR 22	44		x	MR51	28		x
MR127	ca. 90	x		MR38	44		x	MR228	28		x
MR32	86		x	MR119	44		x	MR279	28		x
MR61	85		x	MR13	43*= 24+19		x	MD2.2	28		x
MR103	84	x		MR122	42	x		MR101	26		x
MR74	83	x		MD19.1	42		x	MR106	26		x
MR116	81		x	MR95	41		x	MR155	26		x
MR29	78		x	MR163.1	41	x		MD21	26		x
MR193	77		x	MR64	40		x	MD55	26		x
MR133.2	71		x	MR129	40		x	MR83.2	25	x	
MR172	71		x	MR160	40		x	MR140.2	25		x
MD50	70		x	MD2.1	40		x	MR12	24		x
MR36	ca. 70		x	MR49	ca. 40		x	MR17	24		x
MR86	68	x		MR123	37		x	MR140.1	24		x
MR158	68		x	MR30	36	x		MR156	24		x
MR104	66		x	MR83.1	36	x		MR196	24		x
MR110	65		x	MR115	36		x	MR133.1	23	x	
MD58	65	x		MR166	36		x	MR144	22		x
MR206	64	x		MR173	36		x	MR197	22		x
MD38.2	64	x		MR263	36	x		MD22	22		x
MD53	64		x	MD60	36		x	MR8.1	20		x
MR108	64*= 26+ 38	x		MR230	ca. 35		x	MR201	20	x	
MR139	62		x	MR132	34		x	MR202	20	x	
MR209	60	x		MR199.3	34	x		MR203.2	20		x
MR26	ca. 60	x		MR1	33	x		MR218	20	x	
MR45	59	x		MR157.2	33	x		MD72	20	x	
MR176	59		x	MD20	32		x	MD19.2	19		x
MR97	58		x	MR59	32		x	MR162	18		x
MR111	58		x	MR14	30		x	MR211	18		x
MR53	56		x	MR16	30		x				
Anzahl		13	25	Anzahl		10	28	Anzahl		10	27

(*enthält 2 SSRs, pol.: polymorph, mon.: monomorph)

In der Analyse der Raps-Genotypen waren 21 SSR-Loci auffällig, die sich unterschiedlich im Sommer- und Winterraps-Sortiment verhielten. So erwies sich MR101a im Sommerraps als deutlich höher polymorph als im Winterraps. Der Locus MR228 verhielt sich genau entgegengesetzt. MR123 (Abb. 3.6) sowie der Locus MR216a waren im Winterraps monomorph und im Sommerraps polymorph.

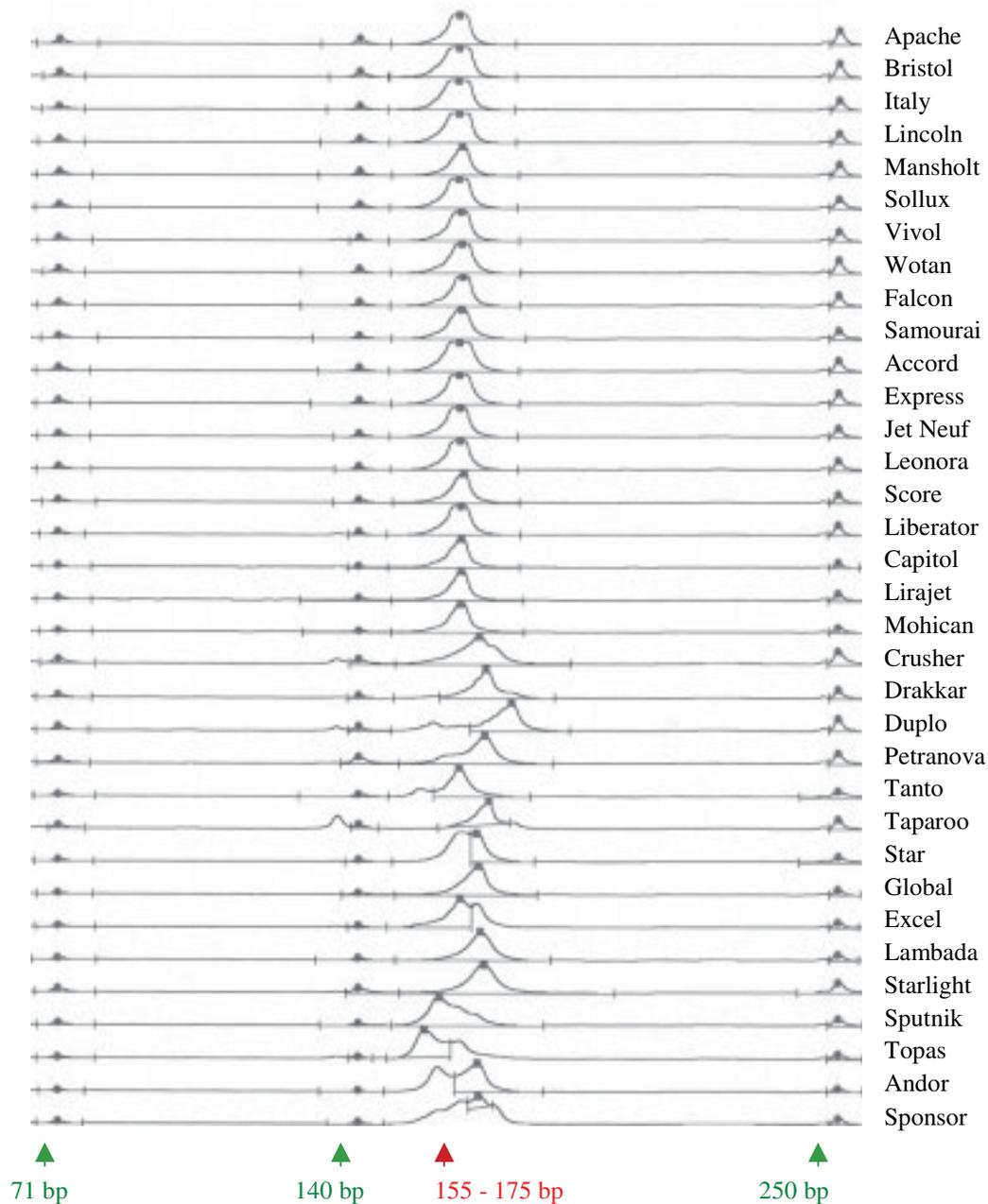


Abb. 3.6: Ein Ausschnitt aus der Analyse von MR123 als Beispiel für das unterschiedliche Verhalten von SSRs im Sommer- und Winterraps. Grün: interner Standard mit 71 bp, 140 bp und 250 bp, rot: Locus MR123 mit mehreren Allelen zwischen 169 bp bis 183 bp.

Weitere 17 SSR-Loci verhielten sich im Winter- und im Sommerraps unterschiedlich. Dies hatte jedoch keine Auswirkung auf die mittlere Allelfrequenz, die beim Winterraps 0,31 und beim Sommerraps 0,32 betrug. Einen Überblick über diese 21 SSR-Loci, die von 19 SSR-Primern nachgewiesen wurden, gibt Tab. 3.16.

Tab. 3.16: SSR-Loci, die Unterschiede in ihrem Verhalten im Sommerraps (SR) und im Winterraps (WR) aufweisen.

SSR-Locus	Unterschiede im SR/ WR
MR8.1a	WR codominant, SR monomorph
MR13a	WR dominant, SR monomorph
MR16	WR monomorph, SR codominant
MR53a	WR dominant, SR codominant
MR54b	WR monomorph, SR codominant
MR101a	WR dominant, SR codominant
MR115	WR dominant, SR monomorph
MR123	WR monomorph SR codominant
MR139a	WR nicht vorhanden, SR dominant
MR139b	WR codominant, SR dominant
MR140	WR codominant, SR monomorph
MR156a	WR codominant, SR dominant
MR176a	WR monomorph, SR codominant
MR213a	WR nicht vorhanden, SR dominant
MR216a	WR monomorph, SR codominant
MR216b	WR dominant, SR codominant
MR228	WR hoher Polymorphismus, SR geringer Polymorphismus
MD2.2c	WR Allel mit 138 bp, SR Allel mit 136 bp
MD19.1a	WR monomorph, SR codominant
MD22	WR monomorph, SR codominant
MD53	WR monomorph, SR codominant

3.6.3 Analyse der „Ankerprimer“ im Raps (*Brassica napus* L.)

Unter den im Raps untersuchten Mikrosatelliten-Primerpaaren befinden sich die in Kap. 3.4 beschriebenen „Ankerprimer“. Bei diesen Mikrosatelliten wurden am 5'-Ende eines der Primer eine „Verankerung“ von 2 bis 13 bp vorgenommen. In dieser „Verankerung“ wurde bei 6 Primern die Restriktionsschnittstelle mit einbezogen.

Alle „Ankerprimer“ wurden im Raps-Sortiment charakterisiert. Tab. 3.17 gibt eine Übersicht über diese Analyse wieder. Die Primerpaare MR157, MD40 und MD92 produzierten keine auswertbaren PCR-Fragmente. Deren „Ankerprimer“ waren mit nur 2 bis 4 Basen „verankert“.

Die Amplifikationsprodukte der Primerpaare MR174 und MD58 wiesen nur das minimale Amplifikationsprodukt, berechnet aus der Sequenzlänge zwischen beiden Primern (= maximales Amplifikationsprodukt), bei der der Mikrosatellit substrahiert und die Primerlänge addiert wurde. Die restlichen 9 Primerpaare amplifizierten auswertbare Bandenmuster. Die „Verankerung“ der „Ankerprimer“ erfolgte hier mit 4 bis 13 Basen. Dies ergab eine kritische Grenze der „5'-Verankerung“ der Primer, die bei 4 Basen lag.

Nach Abzug der 3 „Ankerprimer“, die keine verwertbaren Amplifikationen zeigten, verblieben 11 „Ankerprimer“, die auswertbare und reproduzierbare PCR-Produkte erbrachten. Davon amplifizierten 3 monomorphe Loci und 8 polymorphe Loci (Tab. 3.17). Damit wurde die Anzahl an polymorphen SSR-Primerpaaren um 7,6% erhöht.

Tab. 3.17: Anwendbarkeit und Verhalten der „Ankerprimer“ im Raps.

SSR	Anzahl		auswertbare	
	„Ankerbasen“ (bp)	„Verankerung“ erkennbar ^{d)}	Amplifika- tionsprodukte	polymorph
MD56	13	+	+	+
MR139	9	+	+	+
MR132	7	+	+	+
MD58	7	-	+	-
MD38 ^{a)}	6	+	+	+
MD46 ^{a)}	5	+	+	-
MR146 ^{a)}	4	+	+	+
MR174 ^{a)}	4	-	+	-
MR29	4	+	+	+
MR32	4	+	+	+
MR163.2 ^{b)}	4	+	+	+
MR157 ^{a)}	4	-	-	--- ^{c)}
MD40 ^{a)}	4	-	-	--- ^{c)}
MD92	2	-	-	--- ^{c)}

(^{a)} veröffentlicht unter Varghese et al. (2000), (^{b)} „Verankerung“ inmitten eines imperfekten Mikrosatelliten, (^{c)} nicht auswertbar, (^{d)} amplifiziertes PCR-Produkt entspricht dem maximalen berechneten PCR-Produkt aus dem Primerdesign).

3.7 Charakterisierung der Mikrosatelliten-Primerpaare in den verschiedenen *Brassica*-Arten

Untersucht wurde außerdem die Verwendbarkeit der Mikrosatelliten-Primerpaare für Genom-Analysen in den 6 kultivierten *Brassica*-Arten (U'sches Dreieck, Kap. 1.4). Für die Charakterisierung wurden neben dem amphidiploiden Raps (AACC-Genom) je 3 Sorten der diploiden Arten *Brassica rapa* (AA-Genom) und *Brassica oleracea* (CC-Genom), sowie eine Sorte der diploiden *Brassica nigra* (BB-Genom) mit einem Genotyp und die beiden amphidiploiden Arten *Brassica carinata* (AABB-Genom) sowie *Brassica juncea* (BBCC-Genom) verwendet (Anhang B).

3.7.1 Verhalten der Loci in den untersuchten *Brassica*-Arten

Bei der Analyse der 113 Mikrosatelliten-Primerpaare wurden bei 11 dieser SSR-Primerpaare (MR8.1, MR14, MR17, MR32, MR54, MR64, MR160, MR231, MR279, MD2.2 und MD19.1) zusätzliche Amplifikationsprodukte identifiziert, die mit hoher Wahrscheinlichkeit neue Loci repräsentieren. Wie in Tab. 3.18 aufgeführt, repräsentieren diese dreimal das A-Genom, dreimal das B-Genom, dreimal das C-Genom, einmal das A- und C-Genom und einmal das B- und C-Genom.

Tab. 3.18: Loci, die in den *Brassica*-Arten, aber nicht in *Brassica napus* vorkommen.

SSR-Locus	Genom
MR231b	A
MR279c	A
MD19.1b	A
MR54c	A, C
MR17c	B
MR32c	B
MR160c	B
MR14b	B, C
MR8.1b	C
MR64d	C
MD2.2d	C
Anzahl	11

Durch diese zusätzlichen, genomspezifischen Loci stieg die Gesamtzahl der mit 113 SSR-Primern in *Brassica* nachgewiesenen Loci auf 210. Bei der Betrachtung des gesamten Spektrums der untersuchten *Brassica*-Genome erhöhte sich der Anteil an polymorphen PCR-Produkten auf 90,5%. Der Anteil an monomorphen PCR-Fragmenten lag damit nur noch bei 9,5% (Tab. 3.19).

Tab. 3.19: Übersicht über die Loci in den untersuchten *Brassica*-Arten.

Verhalten in <i>Brassica</i>	Anzahl Loci	Anteil in %
monomorph	20	9,5
polymorph codominant	137	65,2
polymorph dominant	53	25,2
gesamt	210	99,9*

(*Rundungsfehler)

Die 190 polymorphen Loci zeigten in den unterschiedlichen *Brassica*-Arten 2 bis 13 Allele. Die Spanne der Allelzahl vergrößerte sich damit gegenüber *Brassica napus* um 2. Der Durchschnitt lag bei 4,3 Allelen pro Locus und war damit um 0,6 höher als im Raps. Die Verteilung der Allele pro Locus ist in Tab. 3.20 aufgeführt.

Tab. 3.20: Polymorphiegrad der Loci in den untersuchten *Brassica*-Arten.

Allele/ polymorphem Locus	Anzahl	Summe Allele	Anteil in %
2	60	120	31,6
3	36	108	18,9
4	24	96	12,6
5	20	100	10,5
6	16	96	8,4
7	10	70	5,3
8	8	64	4,2
9	2	18	1,1
10	6	60	3,2
11	3	33	1,6
12	4	48	2,1
13	1	13	0,5
2 – 13	190	826	100,0

Weniger als 1/3 (31,6%) der polymorphen Loci besaß nur 2 Allele. Mehr als die Hälfte (60,5%) der Loci wiesen 3 bis 8 Allele auf, wobei der Anteil an Loci mit zunehmender Zahl an Allelen abnahm. Loci mit 9 oder mehr Allelen traten mit einer Häufigkeit von nur 7,9% eher sporadisch auf. Eine Übersicht über die Analyse der 210 Loci in allen untersuchten *Brassica*-Arten ist in Anhang D aufgeführt.

Bei einigen Loci konnte die Herkunft aus dem A- oder dem C-Genom bestimmt werden. Wenn im Genom des amphidiploiden *Raps* (AACC) in einem Locus keine „Nullallele“ auftraten, dieser Locus also nicht dazu neigte, „Nullallele“ zu bilden. Sollte dann in einer der beiden Ausgangsarten des Raps *Brassica rapa* (AA) oder *Brassica oleracea* (CC) kein Locus identifiziert werden und in der anderen Ausgangsart durchgehend Allele vorkommen, so kann davon ausgegangen werden, daß dieser Locus aus dem jeweiligen A- oder C-Genom stammt. Es wurden jedoch nur die Loci als einem Genom zugeordnet betrachtet, die in den jeweiligen BA- bzw. BC-Genom-Arten ein entsprechendes Bild zeigten. Zur Verdeutlichung ist in Abb. 3.7 als Beispiel MR157.2 aufgeführt. Dieser produzierte in der PCR-Reaktion einen monomorphen Locus in *Brassica napus*. Derselbe Locus war im *Brassica rapa*-Genom, aber nicht im *Brassica oleracea*-Genom nachweisbar. Gleichzeitig wurde in *Brassica nigra* (BB) und auch in *Brassica juncea* (BBCC) kein entsprechendes PCR-Produkt identifiziert, wohl aber in *Brassica carinata* (AABB), das ebenfalls das A-Genom enthält. Der Locus konnte somit dem A-Genom zugeordnet werden.

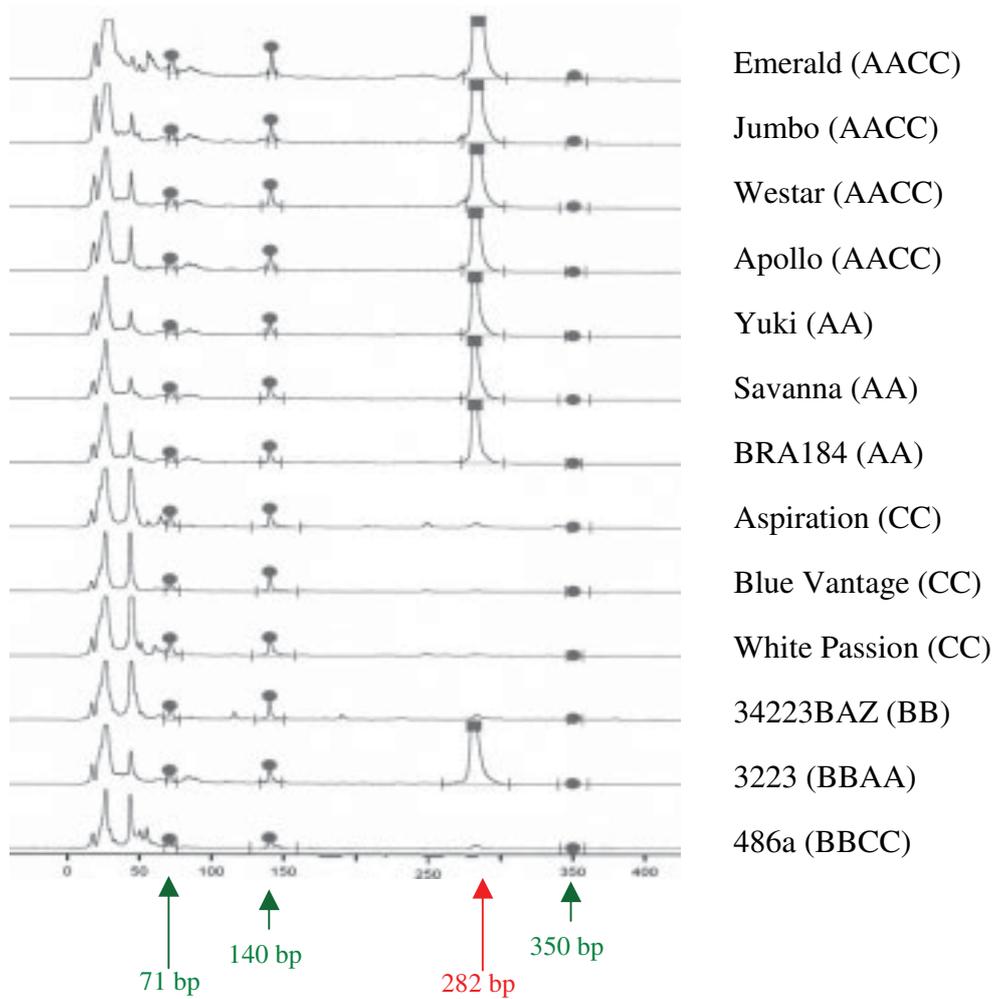


Abb. 3.7: Beispiel für den Nachweis der Herkunft des Locus MR157.2. Grün: interner Standard mit 71 bp, 140 bp, 350 bp, rot: Locus MR157.2, 282 bp.

Es konnte so die Herkunft von 20 Loci nachgewiesen werden, wobei 10 Loci aus dem *Brassica rapa*-Genom und 10 Loci aus dem *Brassica oleracea*-Genom stammten (Tab. 3.21).

Tab. 3.21: Liste der Loci, deren Herkunft aus dem A- bzw. C-Genom nachweisbar war.

Mikrosatelliten-Locus	<i>Brassica rapa</i> (AA)	<i>Brassica oleracea</i> (CC)
MR12a	x	
MR12b		x
MR25a	x	
MR25b		x
MR26a	x	
MR26b		x
MR37a		x
MR37e		x
MR37g		x
MR51a		x
MR51b	x	
MR86b		x
MR122a	x	
MR122b	x	
MR155a	x	
MR157.2	x	
MR213b		x
MR230	x	
MD2.2b		x
MD60b	x	
Summe A- bzw. C-Genom	10	10
Gesamt	20	

Diese Loci können den 11 genomspezifischen Markern, die nur in einem Genom vorkommen (Tab. 3.18), hinzugefügt werden.

Auf der anderen Seite wurden 5 Loci in *Brassica napus* detektiert, die keine Amplifikationsprodukte im A- oder C-Genom aufwiesen. Dies sind die Loci MR17b, MR29c, MR106b sowie MR108a und b. Von diesen besaßen jedoch 4 Loci im Raps „Nullallele“, wodurch keine Aussagen darüber gemacht werden konnte, ob diese Loci raps-spezifisch waren. MR108b neigte dagegen nicht zur Bildung von „Nullallelen“. Dieser Locus schien spezifisch für *Brassica napus* zu sein.

Insgesamt wiesen von den 210 SSR-Loci 154 in den untersuchten *Brassica*-Arten vereinzelt fehlende PCR-Produkte auf. Die höchste Zahl an Fehlamplifikationen wurde

in *Brassica nigra* identifiziert. Hier konnten nur noch 97 Mikrosatelliten-Loci durch die entwickelten SSR-Primerpaare amplifiziert werden.

3.7.2 Bestimmung der genetischen Distanzen

Um die Anwendbarkeit der entwickelten SSR-Marker für Verwandtschaftsuntersuchungen im amphidiploiden Raps bzw. für taxonomische Studien zwischen *Brassica*-Arten zu prüfen, wurden die 190 polymorphen SSR-Loci als Mikrosatelliten-Marker für die Bestimmung genetischer Distanzen verwendet. Für die Berechnung der genetischen Distanzen konnten 672 Allele genutzt werden.

Nach der Übersetzung aller 672 Allele in eine binäre Datenmatrix wurden die genetischen Distanzen nach dem Koeffizienten von DICE (1945) für alle Genotypenpaarungen geschätzt. Innerhalb der Sorten der untersuchten *Brassica*-Arten variierten die kalkulierten Distanzwerte von 0,11 zwischen ‚Liberator‘ und ‚Capitol‘ (beide *Brassica napus*) und 0,82 zwischen ‚34223BAZ‘ (*Brassica nigra*) und ‚Savanna‘ (*Brassica rapa*) mit einem Mittel von 0,42.

In der erstellten Cluster-Analyse zeigten alle diploiden und amphidiploiden Arten klare Gruppierungen. Im Raps war eine Einteilung in Sommerraps und Winterraps erkennbar. Die maximale genetische Diversität lag im Winterraps bei 0,29 und im Sommerraps bei 0,34. Aus der Gruppierung fiel die Sommerraps-Sorte ‚Taparoo‘ heraus. Sie wurde in den Winterraps integriert und bildete hier eine isolierte Untergruppe. Das gesamte *Brassica napus*-Sortiment konnte in Untergruppen mit einer minimalen genetischen Distanz von 0,13 gegliedert werden. Dabei entstanden im Winterraps 7 Untergruppen mit 1 bis 6 Sorten pro Cluster. Im Sommerraps traten ebenfalls 7 Untergruppen mit 1 bis 5 Sorten pro Cluster auf. Die Untergruppen sind in der Clusteranalyse (Abb. 3.8) gekennzeichnet. Die in diese Clusteranalyse integrierte virusresistente Raps-Resynthese-Sorte R54 liegt zwischen dem amphidiploiden AACC- und dem diploiden AA-Genom mit einer Entfernung von 0,03 von *Brassica napus* und 0,18 von *Brassica rapa*. Zusätzlich zeigten *Brassica oleracea* und *Brassica rapa* untereinander eine engere Verwandtschaft als mit *Brassica nigra*.

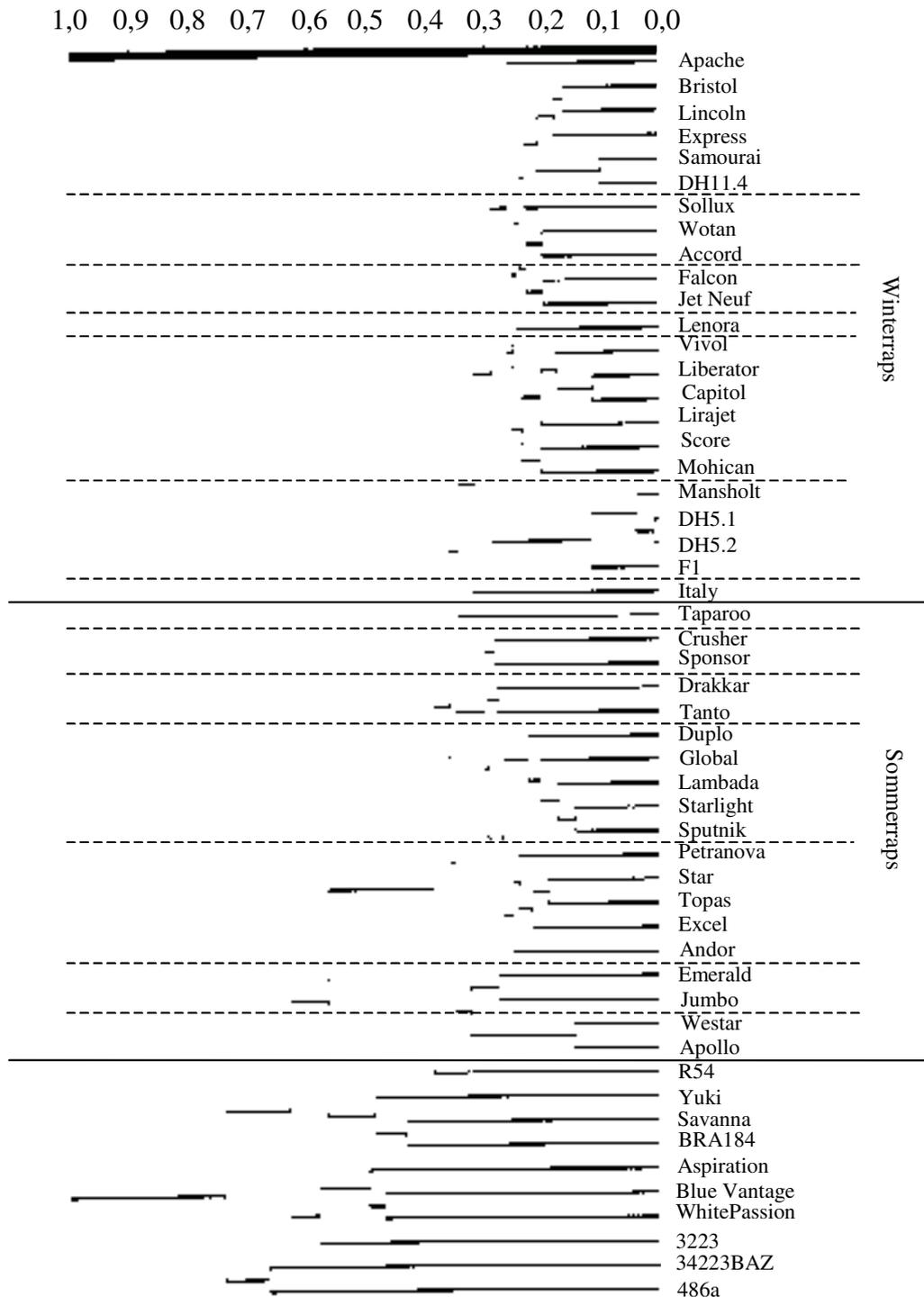


Abb. 3.8: Dendrogramm der Distanzbeziehungen zwischen den 52 Brassicaceen-Genotypen, erstellt nach dem „average linkage“ Verfahren. Die genetischen Distanzen wurden nach DICE (1945) aus 672 polymorphen Allelen geschätzt. Die im Winter- und Sommerraps identifizierten Untergruppen sind durch gestrichelte Linien hervorgehoben. Die durchgehenden Linien grenzen den Sommer- und Winterraps ab.

3.8 „Multiplexing“ und „Multiloading“ der Mikrosatelliten-Primerpaare

Um für Massenanalysen den Arbeits- und Zeitaufwand zu minimieren, wurden während der Charakterisierung der SSR-Primerpaare in den *Brassica*-Arten Versuche zum „Multiplexing“ und „Multiloading“ vorgenommen. Unter „Multiloading“ versteht man das Mischen und damit die gemeinsame Auftrennung verschiedener PCR-Reaktionen mit unterschiedlichen Primerpaaren auf dem Gel in einer Auftrageschale. „Multiplexing“ ist die Verwendung von mehreren Primerpaaren in einer PCR-Reaktion, wodurch mehrere Loci gleichzeitig amplifiziert werden.

Bei der Auswahl der Mikrosatelliten-Marker für das „Multiloading“ wurde darauf geachtet, daß a) der interne Standard für alle verwendeten SSRs gleich war, b) sich die erwarteten Amplifikationsprodukte in der Größe ausreichend voneinander unterscheiden und c) das Gesamtvolumen das Fassungsvermögen der Auftrageschalen nicht überschritt. In diesen Versuchen wurden 2 bis 3 PCR-Reaktionen zusammen aufgetragen. Alle gemeinsam aufgetrennten SSRs konnten ausgewertet werden. Die Anwendung des „Multiloading“ war damit gewährleistet. In Abb. 3.9 ist ein Beispiel für das „Multiloading“ der SSR-Primerpaare MR104 und MR115 dargestellt. Dabei amplifizierte MR104 2 Loci, die beide polymorph waren. MR104b besaß dabei im Brassicaceen-Sortiment, besonders in *Brassica rapa* fehlende Amplifikationsprodukte. MR115 amplifizierte dagegen nur einen Locus, der ebenfalls polymorph war und besonders in *Brassica nigra* fehlende Amplifikationen aufwies.

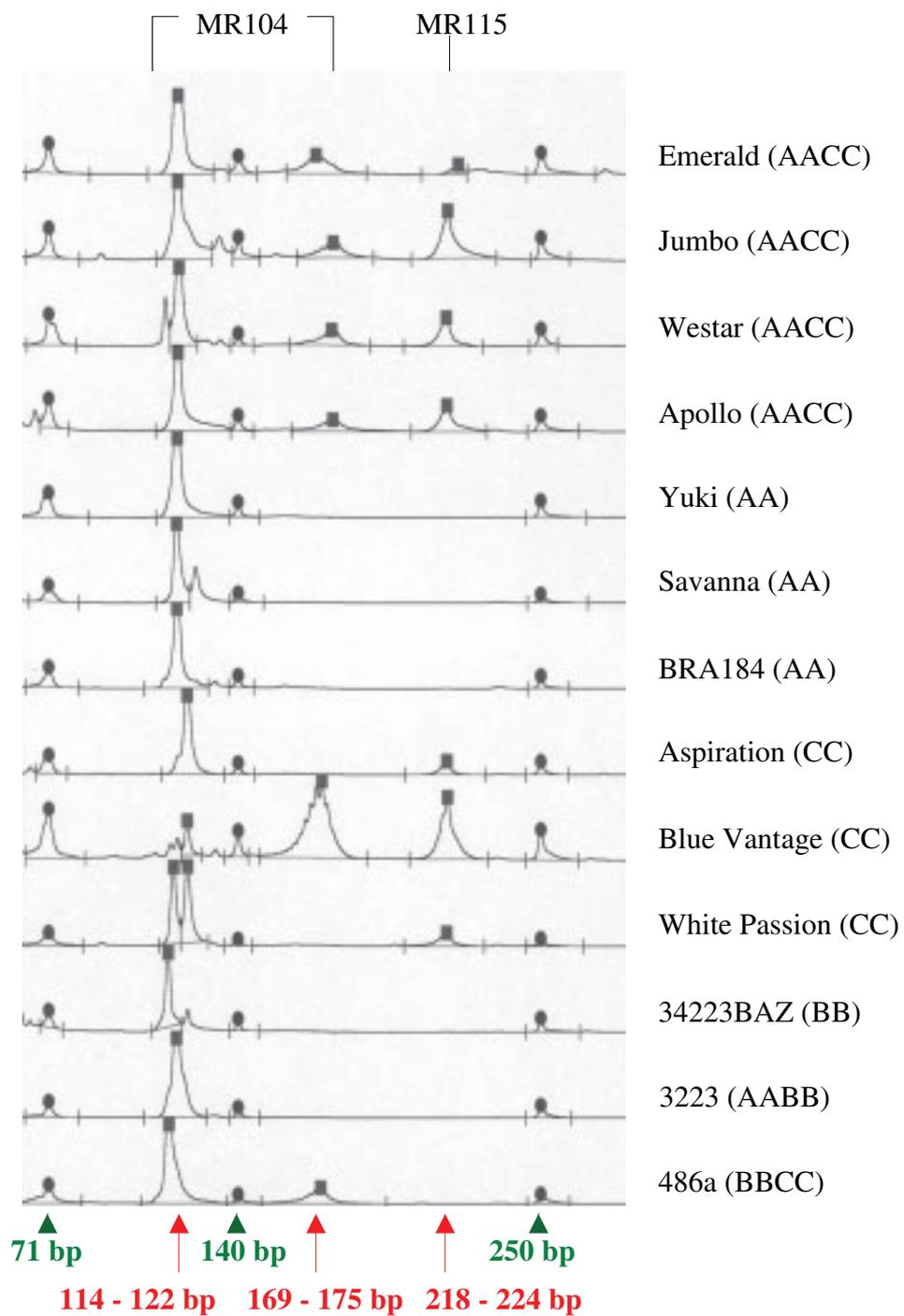


Abb. 3.9: Beispiel zum „Multiloading“, hier mit den SSR-Primerpaaren MR104 und MR115. Grün: interner Standard mit den Größen 71 bp, 140 bp und 300 bp. Rot: a) MR104a: 116 bis 122 bp, b) MR104b: 169 bis 175 bp, c) MR115: 218 bis 224 bp.

Beim „Multiplexing“ wurde ebenfalls darauf geachtet, daß a) der interne Standard für die verwendeten Mikrosatelliten identisch war und b) sich die erwarteten Amplifikationsprodukte in ihrer Größe ausreichend unterschieden. Das Auftragsvolumen mußte ebenfalls für alle PCR-Reaktionen gleich sein. Hier wurde das Volumen gewählt, das auch für die Einzelreaktion verwendet wurde. Weiterhin durfte c) der End-Ta-Wert in der „Touch down“ PCR nicht variieren. Die PCR wurde wie eine Einzel-PCR (Kap.2.2.12) angesetzt, nur daß 2 Primerpaare in normaler Konzentration dazugegeben wurden. Beim „Multiplexing“ wurden jeweils nur 2 Primerpaare miteinander kombiniert. Alle Reaktionen konnten ausgewertet werden. Abb. 3.10 gibt auch hier ein Beispiel. Die SSR-Primerpaare MR163.1 und MR231 wurden in der PCR gemischt. Die Auswertung zeigte einen dominanten Locus in MR163.1 und 2 Loci in MR231. Dabei war das kürzere Amplifikationsprodukt (MR231b) nur in *Brassica rapa* zu erkennen. Der größere Locus (MR231a) war dagegen in *Brassica napus* und *Brassica rapa* monomorph und in *Brassica oleracea* dominant. In *Brassica nigra* konnte kein Amplifikationsprodukt nachgewiesen werden. Auffällig war hier, daß MR231a in *Brassica rapa* durchgehend weniger Amplifikationsprodukte erbrachte. Hier ist MR231b zusätzlich vorhanden. Es scheint daher eine Art Konkurrenz-Reaktion zwischen den beiden Amplifikationen vorzuherrschen, die aber unabhängig von dem „Multiplexing“ mit MR163.1 bestand.

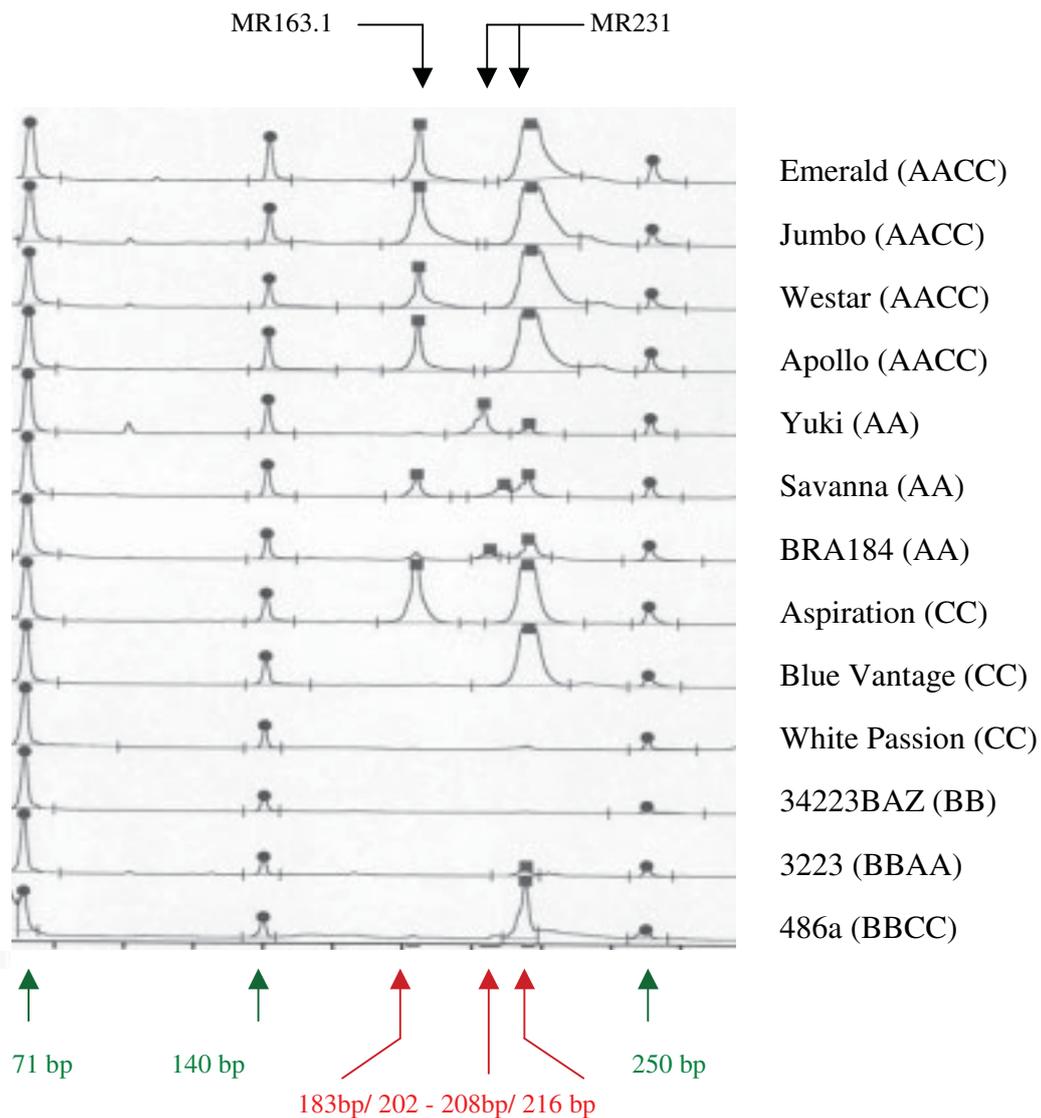


Abb. 3.10: Beispiel zum „Multiplexing“ mit den SSR-Primerpaaren MR163.1 und MR231. Grün: interner Standard mit den Größen 71 bp, 140 bp und 250 bp. Rot: a) MR163.1: 183 bp, b) MR231b: 202 bis 208 bp, c) MR231a: 216 bp.

3.9 Darstellung der SSR-Produkte im Agarose-Gel

Als Alternative zur Darstellung der SSR-Produkte auf einem automatischen Sequenzierer wie dem ALFexpress™ wurden PCR-Produkte einiger Mikrosatelliten-Primerpaare auf hochprozentigen Agarose-Gelen aufgetrennt (Kap. 2.2.13.2). Um die Auflösungsfähigkeit der Polymorphismen in diesem Gelsystem zu untersuchen, wurden SSRs

verwendet, die entsprechend den Untersuchungen auf dem ALFexpress™ Polymorphismen zwischen den einzelnen Raps-Linien von 20 bis 2 bp aufwiesen.

Wie aus den Agarose-Gelen in Abb. 3.11 und Abb. 3.12 sowie den dazugehörigen PCR-Fragment-Größen (Tab. 3.22 und Tab. 3.23) zu erkennen ist, waren Unterschiede von 20 bp bis hinunter zu 4 bp gut zu unterscheiden. Dagegen führte die Auftrennung von SSR-Allelen mit nur 2 bp Längenunterschied zu Schwierigkeiten in der Identifizierung der Allele, da diese nicht mehr von eventuell auftretenden Lauf-Unregelmäßigkeiten im Gel unterschieden werden konnten. Hilfreich erschien hierbei die Verwendung eines internen Standards, der einen Vergleich mit seinen gleichbleibenden Fragmentgrößen ermöglichte.

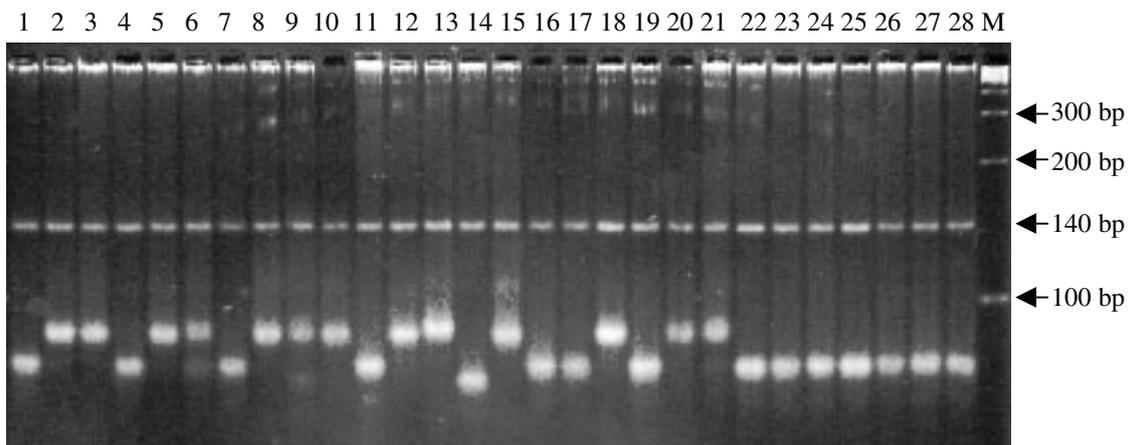


Abb. 3.11: Auftrennung der SSR-Produkte des Mikrosatelliten MR228 mit den ersten 28 Linien des Raps-Sortiments. Lane 1 – 28: Raps-Sorten aus der Tabelle 3.22, Lane M: 100 bp Marker, interner Standard bei 140 bp.

Tab. 3.22: Fragmentgrößen des SSR-Markers MR228.

Raps-Linie	Fragmentgröße		Raps-Linie	Genotyp	Fragmentgröße [bp]
	Genotyp	[bp]			
1	Apache	87	15	Score	88
2	Bristol	90	16	Liberator	83
3	Italy	90	17	Capitol	83
4	Lincoln	83	18	Lirajet	90
5	Mansholt	90	19	Mohican	83
6	Sollux	95	20	Crusher	90
7	Vivol	83	21	Drakkar	90
8	Wotan	90	22	Duplo	83
9	Falcon	90	23	Petranova	83
10	Samourai	92	24	Tanto	83
11	Accord	83	25	Taparoo	83
12	Express	90	26	Star	83
13	Jet Neuf	92	27	Global	83
14	Lenora	81	28	Excel	83

Aus der Auftrennung des Mikrosatelliten MR155 (Abb. 3.12) auf dem Agarosegel wird zusätzlich ersichtlich, daß schwächere Amplifikationsprodukte wie der monomorphe Locus MR155a mittels dieser Auftrennungsmethode nicht mehr erkennbar waren, obwohl dieser im Polyacrylamid-Gel eindeutig identifiziert wurde. Letzteres zeigte damit eine höhere Sensitivität in der Nachweisanalyse.



Abb. 3.12: Auftrennung der SSR-Produkte des Mikrosatelliten MR155 mit den ersten 28 Linien des Raps-Sortiments. Lane 1 – 28: Raps-Sorten aus der Tabelle 3.23, Lane M: 100 bp Marker, interner Standard bei 300 bp.

Tab. 3.23: Fragmentgrößen des SSR-Markers MR155.

Raps-		Fragmentgröße			Raps-		Fragmentgröße		
Linie	Genotyp		[bp]		Linie	Genotyp		[bp]	
1	Apache	93 ^{*)}	168	---	15	Score	93 ^{*)}	168	---
2	Bristol	93 ^{*)}	172	176	16	Liberator	93 ^{*)}	168	176
3	Italy	93 ^{*)}	166/170	---	17	Capitol	93 ^{*)}	168	176
4	Lincoln	93 ^{*)}	168	176	18	Lirajet	93 ^{*)}	168	176
5	Mansholt	93 ^{*)}	172	176	19	Mohican	93 ^{*)}	168	---
6	Sollux	93 ^{*)}	168/172	176	20	Crusher	93 ^{*)}	168	176
7	Vivol	93 ^{*)}	168	176	21	Drakkar	93 ^{*)}	168	176
8	Wotan	93 ^{*)}	166	---	22	Duplo	93 ^{*)}	168	176
9	Falcon	93 ^{*)}	172	176	23	Petranova	93 ^{*)}	168	176
10	Samourai	93 ^{*)}	166	---	24	Tanto	93 ^{*)}	172	176
11	Accord	93 ^{*)}	166	---	25	Taparoo	93 ^{*)}	168	176
12	Express	93 ^{*)}	168	176	26	Star	93 ^{*)}	168	176
13	JetNeuf	93 ^{*)}	168/172	176	27	Global	93 ^{*)}	168	176
14	Lenora	93 ^{*)}	168	176	28	Excel	93 ^{*)}	168	176

^{*)} auf dem Gel nicht erkennbar

3.10 Kartierung der Mikrosatelliten-Marker in der DH-Population von ‚Mansholt‘ und ‚Samourai‘

Zur Kartierung von SSR-Markern in der DH-Population von ‚Mansholt‘ und ‚Samourai‘ standen 50 in diesen beiden Linien polymorphe Loci zur Verfügung. Diese verteilten sich auf insgesamt 40 SSR-Primerpaare. Damit lag der Polymorphiegrad für die SSR-Primerpaare bei 35,4% und in Loci berechnet bei 27,7%.

Zur Kartierung dieser Mikrosatelliten-Marker wurde eine erweiterte Version, der von UZUNOVA et al. (1995) veröffentlichten RFLP-Karte, verwendet. Die erweiterte Karte umfaßte 214 RFLP-Marker, 35 RAPD-Marker und den phänotypischen Marker *pale*, der für die monogen vererbte, blaßgelbe Blütenfarbe von ‚Mansholt‘ (UZUNOVA et al. 1995) verantwortlich ist. Davon waren 249 Marker auf 20 Kopplungsgruppen verteilt, ein RFLP-Marker war ungekoppelt. Die einzelnen Kopplungsgruppen wiesen unterschiedliche Größen sowie Marker-Anzahl und -Dichte auf. In einigen Kopplungsgruppen kamen Cluster von RFLP-Markern vor.

Die Kopplungsanalyse von 34 polymorphen SSR-Markern erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms MAPMAKER (Kap. 2.2.14.4). Die Zweipunktanalyse ergab signifikante Kopplungen für 33 Marker. Unter den gewählten Kopplungskriterien ($LOD > 4,0$; $r < 0,4$) ergab die Zweipunktanalyse signifikante Kopplungsgruppen für 33 der Marker, die damit 12 der 20 bestehenden Kopplungsgruppen zugeordnet werden konnten. Die Kartierung der Marker in den entwickelten Kopplungsgruppen erfolgte anschließend mit Hilfe der Multipunktanalysefunktionen von MAPMAKER. Der SSR-Marker MR29d konnte unter den oben genannten Kriterien in keine Kopplungsgruppe integriert werden. Erst nach Absenken des LOD-Wertes auf 3,0 konnte eine Zuordnung an das untere Ende der Kopplungsgruppe 14 erreicht werden. Dieser Marker wurde nicht in die Kopplungskarte integriert. Die Liste der kartierten SSR-Marker ist in Tab. 3.24 zusammengefaßt.

Tab. 3.24: Kartierte SSR-Marker und ihre Zuordnung zu den Kopplungsgruppen.

Nummer	SSR-Marker	Kopplungsgruppe	Position zwischen den Markern	
1	MR64b	1	RP1415.H2	WG2A11.H1
2	MR133.2b	3	RP1532.H1	RP977.H2
3	MD20	3	RP1457.H1	OPA/18.1
4	MR166b	3	RP1601.H2	RP1108.H1
5	MR156	8	RP1635.E1	RP668.E1
6	MR13a	9	RP1100.E1	RP825.H1
7	MR116	9	WG3H8.E1	RP668.E3
8	MR211b	9	WG3F7.H2	---
9	MR163.2b	12	WG1G4.E1	RP1117a.E1
10	MR64a	12	WG5B1.H1	WG6D6.E1
11	MR163.2a	12	WG6D6.E1	WG1G1.H1
12	MR49b	12	RP459.H1	OPQ20.780
13	MR36	13	cRT21.E1	OPAJ10.660
14	MR229b	13	cRT21.E1	OPAJ10.660
15	MR115	13	cRT21.E1	OPAJ10.660
16	MR148b	13	RP17.E1	OPQJ16.1230
17	MR140	13	RP17.E1	OPQJ16.1230
18	MD2.2c	13	WG4A4.H2	TG3D1.H1
19	MR155	13	RP1198.H1	---
20	MR113a	15	RP1362.E1	OPC19.1090
21	MR51c	15	WG2G4.H1	RP1309.H2
22	MD21a	15	WG2G4.H1	RP1309.H2
23	MR119b	15	RP1309.H2	RP1413.H2
24	MR14	15	RP1413.H2	cRT68.H1
25	MD41d	16	---	WG3F7.H1
26	MR13b	16	WG3F7.H1	RP1175.H1
27	MR216b	16	RP1516.E1	RP1360.E1
28	MR230	16	TG2F9.H1	---
29	MR3	17	WG6F10.H1	RP1230.H1
30	MR108b	17	RP1230.H1	RP1117a.E1
31	MR144	18	---	TG2F12.E1
32	MR97	19	RP981.H1	---
33	MR193c	20	RP1538.H1	---

Die Abstände zwischen den Markern wurden durch die Kosambi-Transformation in cM umgerechnet. Durch die integrierten SSR-Marker vergrößerte sich die Anzahl an Gesamt-Marker auf 282. Die neu erstellte RFLP/SSR-Kopplungskarte wies eine Größe von 1572,8 cM auf, und war damit 131,5 cM größer als die Ausgangskarte (Abb. 3.13).

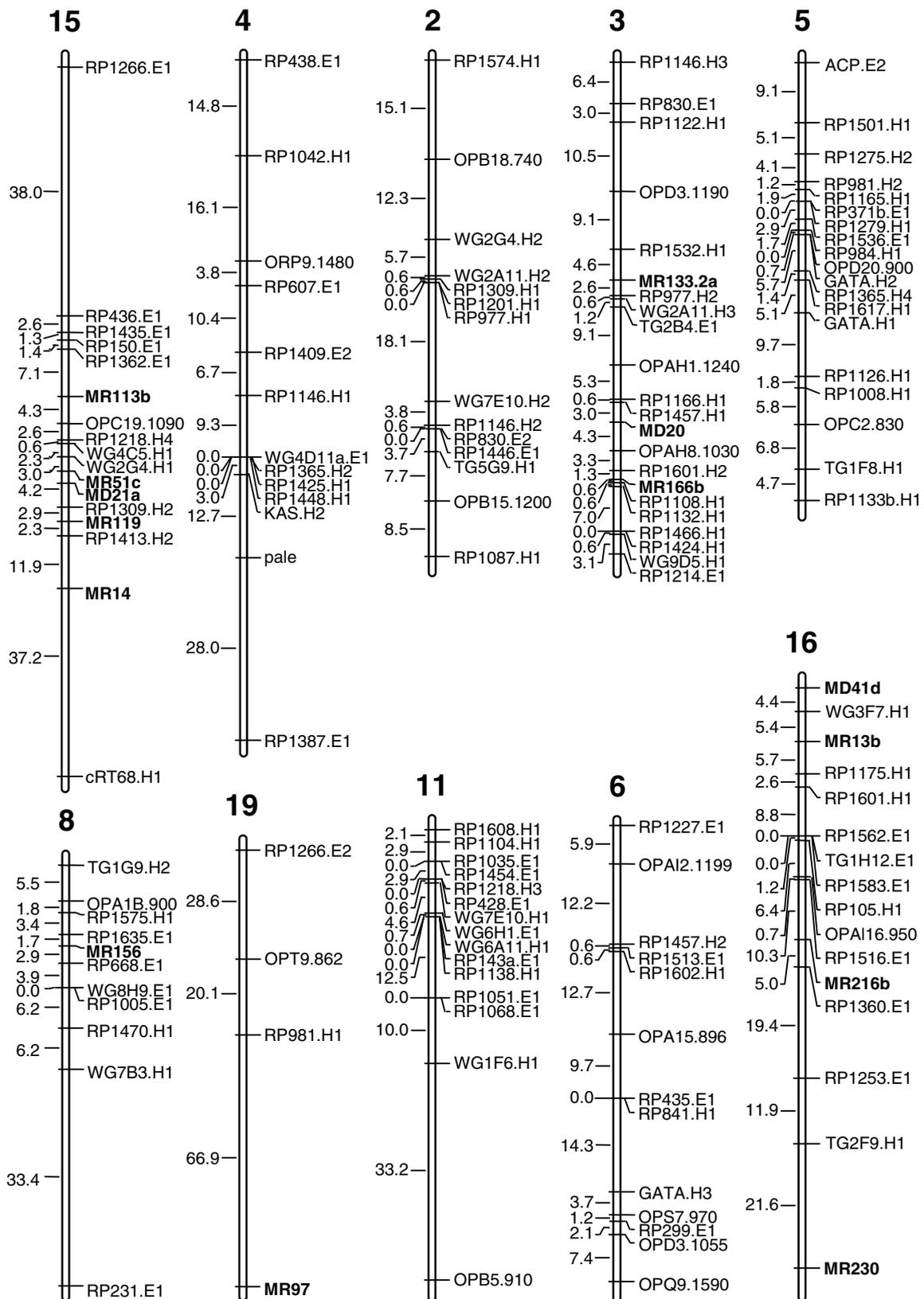


Abb. 3.13: RFLP/SSR-Kopplungskarte des Rapsgenoms. Die Distanzen zwischen den Markern sind in ‚cM‘ angegeben, umgerechnet aus den Rekombinationsfrequenzen nach der Funktion von KOSAMBI (1944).

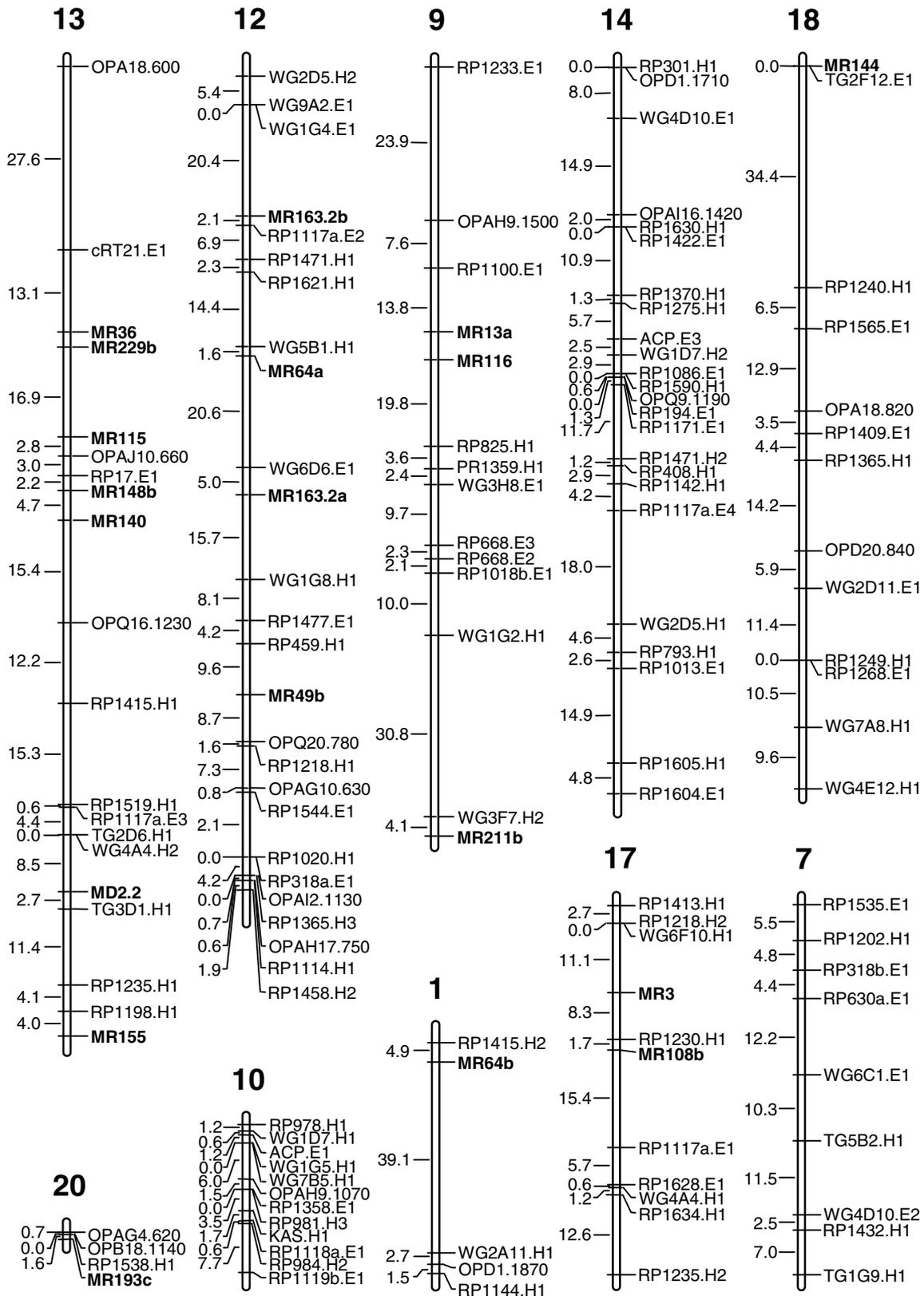


Abb. 3.13 Fortsetzung: RFLP/SSR-Kopplungskarte des Rapsgenoms. Die Distanzen zwischen den Markern sind in ‚cM‘ angegeben, umgerechnet aus den Rekombinationsfrequenzen nach der Funktion von KOSAMBI (1944).

Dabei lagen 6 Mikrosatelliten-Marker an den Enden der Kopplungsgruppen und deckten damit Bereiche des Rapsgenoms ab, die von den RFLP-Markern allein bisher nicht abgedeckt wurden. Besonders hervorzuheben ist die Kopplungsgruppe 19, die durch den SSR-Marker MR97 um 66,9 cM und damit auf mehr als das Doppelte vergrößert wurde. Die Kopplungsgruppe 16 vergrößerte sich an beiden Enden um insgesamt 26,0 cM. Nach Abzug aller endständigen SSR-Marker verbleibt eine Netto-Zunahme der Kopplungsgruppen um 28,7 cM. Der durchschnittliche Markerabstand liegt in der kombinierten RFLP/SSR-Kopplungskarte bei 5,4 cM.

Die SSR-Marker integrierten unter anderem in Cluster mit dichtem Markerbestand (Kopplungsgruppen 3, 8, 15), aber auch in Bereiche, die nicht oder nur wenig durch RFLP-Marker abgedeckt waren (Kopplungsgruppe 1, 13, 16, 19). Dabei ist die Verteilung der SSR-Marker in den Kopplungsgruppen zufällig: Die Mikrosatelliten wurden zentral (Kopplungsgruppe 15) sowie perifer (Kopplungsgruppe 1, 18, 19) oder über die ganze Kopplungsgruppe verteilt (Kopplungsgruppe 12, 13, 16) integriert. Die gesamte Kopplungskarte ist in Abb. 3.13 dargestellt.

Unter den 33 kartierten Mikrosatelliten-Markern waren 3 SSR-Markerpaare, die jeweils von einem SSR-Primerpaar amplifiziert wurden. Das Primerpaar MR163.2 zeigte in der PCR 4 Amplifikationsprodukte, von denen 2 in den Elternlinien der Kartierungspopulation monomorph waren. Die beiden anderen SSR-Loci (MR163.2a und MR163.2b) waren in ‚Mansholt‘ und ‚Samourai‘ dagegen polymorph und konnten kartiert werden. Sie lagen beide auf Kopplungsgruppe 12. Während MR163.2a in der Mitte der Kopplungsgruppe kartierte, lag MR163.2b im oberen Abschnitt (Abb. 3.13).

Der SSR-Primer MR64 produzierte 3 Amplifikationsprodukte, von denen das kleinste (MR64a) in allen untersuchten *Brassica*-Arten monomorph war. Die anderen beiden SSR-Loci waren dagegen in der DH-Population kartierbar. MR64b lag im oberen Abschnitt der Kopplungsgruppe 12, während MR64c im oberen Teil der Kopplungsgruppe 1 lokalisiert werden konnte. In der Kopplungsgruppe 12 wurden bereits von UZUNOVA et al. (1995) Duplikationen gefunden. Der obere Abschnitt dieser Kopplungsgruppe zeigte Homologien zur Kopplungsgruppe 17 und 13.

Die dritte Homologie wurde in der Mitte der Kopplungsgruppe 9 und im oberen Teil der Kopplungsgruppe 16 identifiziert. Hier lagen die SSR-Loci MR13a und MR13b. Der SSR-Primer MR13 produzierte nur diese beiden Loci.

Zusätzlich wurde die Herkunft von 2 kartierten Mikrosatelliten-Marker bestimmt: MR230 (Kopplungsgruppe 16) und MR51c (Kopplungsgruppe 15) konnten dem A-Genom zugeordnet werden.

4. Diskussion

4.1 Häufigkeit der Mikrosatelliten-Motive GA und CA im Rapsgenom

Aus DNA-Sequenz-Datenbanken geht hervor, daß Mikrosatelliten im Rapsgenom alle 29 kb vorkommen. Etwas mehr als 1/4 dieser SSRs bestehen aus GA-Motiven, so daß diese im Rapsgenom alle 125 kb (LAGERCRANTZ et al. 1993), bzw. alle 100 kb vorkommen (KRESOVICH et al. 1995, UZUNOVA und ECKE 1999). Das seltenere CA-Motiv tritt ca. alle 350 kb (LAGERCRANTZ et al. 1993), 400 kb (UZUNOVA und ECKE 1999), bzw. 440 kb (KRESOVICH et al. 1995) auf. Daraus läßt sich ein Verhältnis GA- zu CA-Motiv von 3:1 (LAGERCRANTZ et al. 1993) bzw. von 4:1 (UZUNOVA und ECKE 1999) ableiten. Dieses 4:1 Verhältnis wurde auch in der Sojabohne von WANG et al. (1994) gefunden und scheint daher nicht rapsspezifisch zu sein.

In der vorliegenden Arbeit wurden 60.000 Phagen aus der genomischen DNA-Phagenbank untersucht. Bei der Annahme, daß die DNA-Inserts ca. 200 bis 800 bp und im Mittel ca. 500 bp enthielten, wurden insgesamt ca. 30.000 kb und damit ca. 2,3% des $1,3 \times 10^6$ kb umfassenden Rapsgenoms auf GA- und CA-Motive tragende Mikrosatelliten hin untersucht. Hier zeigten 286 Plaques in der 2. Hybridisierung nach der Vereinzelung der Phagen positive Signale. Damit kam ca. alle 105 kb ein SSR mit einem dieser beiden Motive vor.

Bei der Betrachtung der einzelnen Motive ist eine eindeutige Verteilung zugunsten des GA-Motivs erkennbar, wobei das Verhältnis von 5:1 (Tab. 3.5) für GA- zu CA-Motiven gegenüber den Literaturwerten etwas erhöht vorlag. Da beide Motive alle 105 kb im Rapsgenom vorkamen, trat das GA-Motiv damit alle 125 kb und das CA-Motiv alle 630 kb auf. Dabei beruhten diese Schätzungen auf den Werten der 2. Hybridisierung, bei denen ein großer Teil an „falsch positiven Klonen“ eliminiert werden konnte, was eine genauere Auswertung zuließ. Auf der anderen Seite kann der Verlust an SSR-haltigen Klonen durch fehlerhafte Hybridisierungen nicht ausgeschlossen werden. Die Angaben

über Häufigkeit und Vorkommen von Mikrosatelliten können daher nur als grobe Schätzungen gewertet werden.

4.2 Technische Entwicklung von Mikrosatelliten-Markern

BROWN et al. konnten 1996 bei der Suche nach SSR-Motiven in der genomischen DNA-Bank von Hirse durch einen zusätzlichen Hybridisierungsschritt 70% der gesamten Hybridisierungssignale als „falsch positive“ Klone eliminieren. Dieser Vereinzlungsschritt (2. Hybridisierung) wurde auch in der vorliegenden Arbeit in die SSR-Entwicklung integriert. So konnten ca. 1/3 der Phagen als „falsch positiver Klone“ erkannt werden, die damit aus der weiteren Analyse herausfielen. Durch diese frühe Erkennung von unspezifischen Hybridisierungssignalen wurde die Anzahl der Gesamtklone für die „*in vivo* excision“ (Tab. 3.1) und die späteren Sequenzierungen im hohen Maße gesenkt. Dadurch wurde die Suche nach den Mikrosatelliten in der DNA-Phagenbank erheblich gekürzt. Bei der „*in vivo* excision“ kam es zu einem weiteren Verlust von Klonen, so daß eine Gesamtausbeute von 0,27% (bei 162 Mikrosatelliten-Klonen aus 60.000 Phagen) erzielt wurde.

Alle 162 positiven Klone wurden von beiden Seiten aus sequenziert, um die isolierten SSRs zu identifizieren. Die Sequenzanalysen zeigten, daß nur noch 16,7% der Mikrosatelliten-Klone „falsch positiv“ waren (Tab. 3.2). Ohne den zusätzlichen Selektionsschritt in der 2. Hybridisierung wäre die Anzahl der Klone ohne SSR viel höher ausgefallen. Hieraus wird ebenfalls deutlich, daß der Vereinzlungsschritt vor der Umwandlung in SSR-Klone zum frühzeitigen Aussortieren „falsch positiver Klone“ geeignet war.

Neben den beiden GA- und CA-Motiven, die in der Hybridisierung als Sonde Verwendung fanden, wurden in der Sequenzierung weitere Motive wie A-, TA-, ATA- und GTT-Motive isoliert. Diese SSR-Motive lagen in fast allen Fällen zusammen mit den getesteten Mikrosatelliten-Motiven vor, entweder in zusammengesetzten Mikrosatelliten oder als 2 SSRs auf einem Klon und wurden auf diese Weise mit isoliert. Dies zeigt, daß die dreifache Hybridisierungsmethode trotz hoher Anzahl an „falsch positiven

Signalen“ im ersten Screening sehr spezifisch bestimmte SSRs aus der genomischen DNA-Bank herausfiltern konnte.

Das Vorkommen von mehreren Mikrosatelliten in einem Klon wurde bereits bei anderen Pflanzenarten wie der Sojabohne (AKKAYA et al. 1992), der Akazie (BUTCHER et al. 2000) und bei tropischen Bäumen (CONDIT und HUBBELL 1991) beschrieben. BUTCHER und Mitarbeiter (2000) fanden meistens CA-Motive, die in der Akazie in Kombination mit anderen Motiven vorkamen. In den Raps-Linien ‚Mansholt‘ und ‚Samourai‘, den Ausgangssorten der genomischen DNA-Bank, waren es dagegen fast ausschließlich GA-Motive, die größtenteils mit GA-, aber auch mit anderen Motiven zusammen vorlagen (Anhang C). Mikrosatelliten können damit in Pflanzen zusammengelagert vorkommen, es können aber keine Angaben darüber gemacht werden, welches SSR-Motiv eher mit anderen Mikrosatelliten kombiniert vorliegt. Durch diese Kombination mehrerer SSRs in einem Klon erhöhte sich die Ausbeute an Mikrosatelliten von 129 auf 148 (Tab. 3.3).

Die Sequenzierung der Mikrosatelliten selbst erwies sich größtenteils als schwierig, weil die SSRs stark dazu neigen, Sekundärstrukturen zu bilden. *In vivo* kommt es gerade wegen dieser Sekundärstrukturen während der Replikation zu „Slippage“-Vorfällen und dem damit verbundenen „missparing“, wodurch die hohe Polymorphie-Rate der SSR-Loci verursacht wird (EFSTRATIODIS 1980, LEVINSON und GUTMAN 1987, SMEETS et al. 1989, LUTY et al. 1990 und AYRES SIA et al. 1997). Bei der *in vitro*-Sequenzierung mit der T7-Polymerase dagegen verursachten diese Sekundärstrukturen, besonders bei poly-GA-Sequenzen als Template, den vorzeitigen Abbruch der Reaktion. Sobald ein Mikrosatellit identifiziert wurde, brach auch die Reaktion ab, so daß der Mikrosatellit selbst nicht weiter charakterisiert und auch die Sequenz hinter dem SSR nicht erfaßt werden konnte. Diese war aber für das darauffolgende Primerdesign unerlässlich. Deswegen wurden die SSR-Klone grundsätzlich von beiden Seiten her sequenziert. Trotzdem war der Mikrosatellit selbst in Typ und Motiv oft nicht eindeutig charakterisierbar.

Eine bessere Auflösung der Sekundärstrukturen erbrachte das „Cycle-Sequencing“ (Kap. 2.2.7.2), weil hier die Reaktion bei höheren Temperaturen ablaufen konnte. Obwohl nicht alle Sekundärstrukturen aufgelöst werden konnten, wurden durch das

„Cycle-Sequencing“ der Verlust an nicht weiter charakterisierbaren Mikrosatelliten auf nur 5,4% abgesenkt. Modifikationen der Sequenzierungsreaktion, wie die Zugabe von DMSO und die Erhöhung der Denaturierungs- sowie Annealing-Temperatur oder das Denaturieren der DNA vor Zugabe des Reaktionsmixes, wie von WINSHIP (1989) und BACHMANN et al. (1990) für zur Sekundärstruktur-Bildung neigende DNA-Sequenzen vorgeschlagen, ergaben dagegen bei der Sequenzierung von Mikrosatelliten keine weiteren Verbesserungen.

Im Auswahlverfahren der Primerpaare für die Analyse der Mikrosatelliten in der PCR-Reaktion verminderten mehrere Faktoren die Ausbeute an nutzbaren Mikrosatelliten (Tab. 3.6). Die größte Gruppe, der in der Literatur als nicht verwertbar dargestellten Mikrosatelliten, sind SSRs, die zu nah an einem Ende des Klonen liegen (LAGERCRANTZ et al. 1993, BROWN et al. 1996, SUN et al. 1998). Hier ist eine der flankierenden Regionen entweder zu kurz oder sie fehlt bis auf die Schnittstelle vollkommen. In dieser Arbeit fehlte bei fast 10% der identifizierten Mikrosatelliten eine flankierende Region, die damit die größte Verlustgruppe in diesem Arbeitsschritt darstellen sollte.

Um diese Mikrosatelliten trotz fehlender flankierender Region an einem Ende weiter nutzen zu können, wurde die Herstellung der Primer modifiziert (Kap. 2.2.8.1). Dabei wurde auf eine andere Methode der Verwendung von Mikrosatelliten als molekulare Marker zurückgegriffen: Bei der direkten Verwendung der SSRs als Primer werden Regionen zwischen den Mikrosatelliten amplifiziert, das sog. Inter-SSR-Fingerprinting. Diese Primer werden an einem Ende der Mikrosatelliten durch spezifische Basen fixiert (ZIETKIEWITZ et al. 1994, KOSTIA et al. 1995 und CHARTERS et al. 1996, FISCHER et al. 1996). In der PCR entstehen mehrere Amplifikationsprodukte, die Größen zwischen 200 und 2000 bp aufweisen. In der vorliegenden Arbeit wurden 13 5'-verankerte SSR-Primer zusammen mit einem locusspezifischen Primer verwendet (Kap. 2.2.8.1). Eine zweite Anwendungsmöglichkeit dieser „Ankerprimer“ ergab sich bei einem der Mikrosatelliten, der zum Design von PCR-Primern zu lang war. Dieser wurde durch einen „Ankerprimer“ innerhalb des Mikrosatelliten selbst gekürzt (Kap. 3.4). Dies war hier möglich, weil es sich um einen imperfekten Mikrosatelliten handelte, der ausreichend interne Basen besaß, die zur Verankerung geeignet waren. Wie alle Primerpaare wurden auch die Paare mit den „Ankerprimern“ auf ihre Funktion in

der PCR mit DNA aus den Raps-Linien ‚Mansholt‘ und ‚Samourai‘ überprüft. Zusätzlich sollte bei diesen „Ankerprimern“ darauf geachtet werden, daß ihre Primerverankerungen erfolgreich waren, und folglich die Amplifikationsprodukte Größen aufwiesen, die den Amplifikationsgrößen entsprachen, die bei der Herstellung der Primerpaare berechnet wurden. Bei einer fehlenden Verankerung würde das tatsächliche PCR-Fragment die Größe des Amplifikationsproduktes ohne Mikrosatelliten ergeben, plus der Länge des Ankerprimers (VARGHESE et al. 2000). Bei der Einteilung der „Ankerprimer“ nach der Anzahl der Verankerungsbasen und ihrer Überprüfung auf ihre Funktion hin war erkennbar, daß die minimale Anzahl der „Ankerbasen“ bei 4 liegt. Lediglich ein Primer (MD58) wies bei einer Verankerung von 7 Basen das minimale Amplifikationsprodukt ohne Mikrosatelliten auf. In der Analyse des Raps-Sortimentes zeigte der Locus gleichbleibende Produktgrößen. Von den 14 „Ankerprimern“ konnten insgesamt 5 nicht verwendet werden (Tab. 3.17). Die restlichen 9 konnten in das Polymorphismen-Screening der Raps-Sorten und *Brassica*-Arten integriert und wie alle anderen Primerpaare behandelt werden. Es konnte gezeigt werden, daß der Einsatz von Kombinationen aus „5‘-verankerten SSR-Primern“ mit locusspezifischen Primern dem „normaler“ Mikrosatelliten-Primerpaaren gleichzusetzen ist.

4.3 Analyse der Mikrosatelliten in Bezug auf ihre Nutzung als molekulare Marker

Zahlreiche Untersuchungen zur Abhängigkeit des Polymorphiegrades der Mikrosatelliten von ihrer Größe, ihrem Motiv und ihrem Typus wurden bisher durchgeführt, um die Randbedingungen bei der Entwicklung von Mikrosatelliten-Markern einengen zu können. Dabei variierten die Ergebnisse z. T. erheblich.

Mehrere Autoren verglichen in verschiedenen Organismen die Größe der identifizierten Mikrosatelliten mit ihrem Polymorphiegrad: GRIST et al. (1993) im menschlichen Genom mit 4 Mikrosatelliten, SUN et al. (1998) bei *Triticale* mit 6 SSRs, BUTCHER et al. (2000) bei der Akazie mit 33 Mikrosatelliten sowie VAN DE VEN und MCNICOL (1996) bei Nadelhölzern (5 SSRs). Letztere leiteten diese Abhängigkeit daraus ab, daß der kleinste SSR die niedrigste Allelzahl (3 Allele) und der größte Mikrosatellit auch die höchste Allelzahl (15 Allele) aufwies. Die Autoren kamen zu

dem Ergebnis, daß die Häufigkeit des Auftretens von Polymorphismen mit der SSR-Größe korreliert.

BELL und ECKER (1994) fanden dagegen bei *Arabidopsis* für 30 SSRs keine Abhängigkeit des Polymorphiegrades von der Größe des SSRs. Zu den gleichen Ergebnissen kamen WEBER (1990) beim Menschen (100 SSRs) und MA et al. (1996) im Weizen (124 SSRs).

Während WEBER (1990) eine Faustregel für die Entwicklung von SSR-Markern von mindestens 10 Wiederholungen pro Mikrosatellit festlegte und VAN DE VEN und MCNICOL (1996) diese Regel bestätigten, gehen MÖRCHEN et al. (1996) mit ihren Ergebnissen bei der Zuckerrübe davon aus, daß kleine SSRs kurze Allele eines Locus sein könnten und deswegen nicht ignoriert werden sollten. STEINKELLNER et al. (1997) identifizierten bei der Eiche ebenfalls einen polymorphen SSR-Locus, dessen sequenziertes Allel nur 4 Wiederholungen besaß, der aber 5 weitere größere Allele zeigte. Die Ergebnisse dieser Arbeit stimmen mit denen der letztgenannten Autoren überein, denn es konnte keinerlei Abhängigkeit der Polymorphierate von der Größe der Mikrosatelliten erkannt werden (Tab. 3.15). SSRs mit weniger als 10 Wiederholungen sollten daher, anders als von WEBER 1990 vorgeschlagen, nicht bei der Entwicklung von Mikrosatelliten-Markern ausgeschlossen werden.

BELL und ECKER (1994) stellten zwar fest, daß der Polymorphismus bei *Arabidopsis* unabhängig von der Größe des SSRs ist, aber Abhängigkeiten zu dessen Motiv aufwiesen. Dabei sei besonders das CA-Motiv nicht informativ und deswegen als Marker nicht verwendbar und SSRs mit AT-Motiv, aufgrund der Selbstkompatibilität der Sequenz nicht isolierbar. Im Gegensatz dazu konnten AKAGI et al. (1997) AT-haltige SSRs aus Datenbanken sehr gut identifizieren und bezeichneten diese als am höchsten polymorph. MA et al. (1996) fanden wiederum im Weizen keine Abhängigkeit des Polymorphiegrades von der SSR-Größe oder Zusammensetzung.

In der vorliegenden Arbeit konnten beim Raps ebenfalls keine Abhängigkeiten des Polymorphiegrades in Bezug zum Motiv festgestellt werden. Dabei konnten nur die beiden SSR-Motive GA und CA miteinander verglichen werden. Die anderen zufällig mit identifizierten Motive waren in ihrer Anzahl zu gering, um daraus den Schluß

ziehen zu können, ob diese den Polymorphismus des Mikrosatelliten beeinflussen. Das GA-Motiv zeigte in 73,9% einen Polymorphismus. Das CA-Motiv wies in 62,5% Polymorphismen auf (Tab. 3.14). Insgesamt lag die Polymorphierate über alle SSR-Primer bei 70,8% (Tab. 3.14). Bei diesen Angaben ist zu bemerken, daß das CA-Motiv fünffach weniger vorhanden war als das GA-Motiv. Ein einzelner SSR macht in dieser Form der Berechnung schon einen Unterschied von 6,3% aus. So läßt sich der Unterschied zwischen den beiden Motiven von 10,7% leicht verändern, wenn zufällig ein anderer CA-Motiv-haltiger Mikrosatellit untersucht worden wäre.

Dem CA-Motiv wurde außerdem eine Neigung zur „Clusterung“ mit AG-Motiven (BUTCHER et al. 2000) und auch anderen Motiven (CONDIT und HUBBELL 1991) nachgewiesen. Im Rahmen dieser Arbeit konnten beim Raps dagegen derartige CA-Motiv-Kombinationen lediglich in 2 Fällen festgestellt werden: In den anderen Klonen, in denen mehrere SSRs gefunden wurden, lagen GA-Motive in Kombination mit GA- oder anderen Motiven vor. Für die Markerentwicklung sollten aus diesem Grund auch keine bestimmten Mikrosatelliten-Motive ausgeschlossen werden.

Bei der Einteilung der Mikrosatelliten nach ihrem Typus ließ sich ebenfalls keine Abhängigkeit des Polymorphiegrades vom SSR-Typ erkennen. Hier waren 73,3% der perfekten und 67,4% der imperfekten Mikrosatelliten polymorph (Tab.3.13). Die Anzahl zusammengesetzter SSRs war mit 2 zu gering, um in diese Untersuchungen mit eingeschlossen zu werden. Eine geringere Polymorphierate in imperfekten SSRs, wie bei TARAMINO und TINGEY (1996) aus einer Auswahl von 34 SSRs für Mais beschrieben, konnte beim Raps nicht bestätigt werden. Außerdem scheint der Übergang von perfekten und imperfekten Mikrosatelliten fließend zu sein, was Sequenzanalysen einzelner Allele eines SSRs von BLANQUER-MAUMONT und CROUAU-ROY (1995), STEINKELLNER et al. (1997) und DAVIERWALA (2000) gezeigt haben. Hier lagen in 2 Allelen des selben Locus ein perfekter Mikrosatellit und ein imperfekter SSR vor.

4.4 Alternative Methoden zur Identifizierung von Mikrosatelliten

Das Durchsuchen einer genomischen DNA-Bank mit Mikrosatelliten-Motiven und der anschließenden Sequenzierung positiver Klone erwies sich als sehr zeitintensiv und kostenaufwendig. In der Literatur wurden Alternativen beschrieben, die die Identifizierung von Mikrosatelliten im Genom um ein Vielfaches verkürzen. Hierzu gehört das Erstellen einer genomischen DNA-Bank, die mit Mikrosatelliten angereichert wurde sowie das Durchsuchen von DNA-Sequenz-Datenbanken.

Bei der Anreicherung einer DNA-Bank mit Mikrosatelliten wurden z. B. SSR-Motive an eine Membran gebunden. Die isolierte genomische DNA wurde vor der eigentlichen Suche nach Mikrosatelliten an diese membranfixierten SSR-Motive geheftet. Durch einen Waschvorgang wurde die ungebundene DNA – die keine Mikrosatelliten enthält – entfernt, bevor die mit Mikrosatelliten angereicherte DNA wieder von der Membran gelöst und kloniert wurde.

EDWARDS et al. (1996) erhielten mit dieser Methode nach dem Sequenzieren eine Ausbeute von 50 bis 70% SSR-haltiger Klone aus pflanzlichen DNA-Banken. Nach der in dieser Arbeit durchgeführten dreifachen Hybridisierung ergab die Sequenzierung eine Ausbeute von 79,6% SSR-haltiger Klone (Tab. 3.2).

Obwohl EDWARDS et al. (1996) bei diesen angereicherten DNA-Banken in mehreren Pflanzen keine selektive Anreicherung bestimmter Mikrosatelliten-Motive erkennen konnten, bestanden 30% der aus dieser DNA-Bank identifizierten SSR-Motive aus CA-Einheiten. GA-Motive kamen nur zu 20% vor. Auch BUTCHER et al. (2000) gaben bei der Verwendung von mit Mikrosatelliten angereicherten DNA-Banken aus der Akazie, $(CA)_n$ als häufigstes SSR-Motiv an. Dabei treten bei Pflanzen nach anderen, umfangreicheren Untersuchungen, die zudem mit verschiedenen Methoden durchgeführt wurden, als häufigste Dinukleotid-Motive das TA- gefolgt von dem GA-Repeat auf (LAGERCRANTZ et al. 1993, MORGANTE und OLIVIERI 1993, WANG et al. 1994).

Obwohl in dieser Arbeit zur Hybridisierung der genomischen DNA-Bank mit den beiden Sonden poly-GA und poly-CA überwiegend GA-Motive in den Mikrosatelliten identifiziert wurden (Tab. 3.5), zeigte das CA-Motiv bei der Überprüfung der Markierung dieser Sonden mit Hilfe des Dot Blots immer das stärkere Signal (Abb. 3.1d). Weiterhin wurde beobachtet, daß während der Sequenzierungen von SSR-Klonen das GA-Motiv in der Template-DNA häufig zu nicht oder nur schwer auflösbaren Sekundärstrukturen führte. Dies könnte schon während des Hybridisierungsvorgangs zu einer Selektion zugunsten leichter hybridisierender SSR-Motive führen, was damit zu einer Verschiebung der Schätzung des Vorkommens von Mikrosatelliten-Motiven bei der Verwendung angereicherter DNA-Banken führen kann.

Eine andere, noch weniger aufwendige Methode ist der Rückgriff auf bereits bekannte und veröffentlichte Sequenzen. Mikrosatelliten können schnell durch das Durchsuchen von DNA-Sequenz-Datenbanken identifiziert werden (DEPEIGES et al. 1995, BROWN et al. 1996). Diese Datenbanken bestehen jedoch bisher zum größten Teil aus codierenden Sequenzen, die wissenschaftlich von größerem Interesse sind. Da nur ein kleiner Bruchteil an SSRs innerhalb oder in der Nähe von Genen liegt, war die Ausbeute identifizierter SSRs durch DNA-Sequenz-Datenbanken bisher nur sehr gering (BROWN et al. 1996). Außerdem handelt es sich hierbei sehr oft um GC-reiche Trinucleotide mit einem niedrigeren Polymorphiegrad, weil diese SSRs durch ihre Lage in der Nähe von Genen, oder in Genen, einem höheren Selektionsdruck als Mikrosatelliten in nicht codierenden Sequenzen unterliegen (BROOK et al. 1992, BROWN et al. 1996). Bei der in dieser Arbeit durchgeführten Identifizierung von Mikrosatelliten in DNA-Banken können dagegen gezielt die mehr Polymorphismen aufweisenden Dinukleotid-Motive detektiert werden.

Um die geringe Anzahl hoch informativer SSRs aus den Datenbanken ausgleichen zu können, wurde der Versuch unternommen, SSRs verschiedener Arten aufeinander zu übertragen. Die Ergebnisse waren jedoch unterschiedlich: SSR-Marker konnten in verschiedenen Getreide-Arten erfolgreich angewendet werden (RÖDER et al. 1995, DAVIERWALA et al. 2000). ZHAO und KOCHERT gelangen 1993 die Anwendung von Reis-Mikrosatelliten-Markern in Mais und Bambus, WEISING und GARDNER amplifizierten 1999 mit Primern aus Tabak-Chloroplasten-SSRs Amplifikationsprodukte in *Solanaceen* und anderen Angiospermen. Ebenfalls konnten aus Tomaten

isolierte SSRs in Kartoffeln amplifiziert werden und umgekehrt (PROVAN et al. 1996). Hier handelt es sich möglicherweise um Mikrosatelliten, die in konservierten Regionen des Genoms vorkommen (ZHAO und KOCHERT 1993, PROVAN et al. 1996, DAVIERWALA et al. 2000).

Dagegen zeigten BUTCHER et al. 2000, daß sich Mikrosatelliten-Marker bereits innerhalb verschiedener Akazien-Arten schlechter transferieren ließen als RFLP-Marker. DAYANANDAN et al. berichteten 1998, daß die Anwendung von SSRs innerhalb von *Populus*-Arten mit abnehmendem Verwandtschaftsgrad ebenfalls schwieriger wird. LAGERCRANTZ et al. wiesen dies bereits 1993 für *Brassica*-Arten nach, was durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigt werden kann. Die Anzahl an Fehlamplifikationen stieg mit abnehmendem Verwandtschaftsgrad an. Weniger als 1/2 der aus *Brassica napus* isolierten SSR-Marker wies in *Brassica nigra* Loci auf.

Das Screening von DNA-Sequenz-Datenbanken wird zukünftig jedoch immer mehr an Bedeutung gewinnen. Durch Massen-Sequenzierungsprojekte wie das *Arabidopsis*- (DELSENY et al. 1997) oder das Reis-Genom-Projekt (SASAKI et al. 1996) werden zur Zeit ganze Pflanzengenome entschlüsselt, deren Sequenzen leicht nach SSR-Motiven aller Art durchsucht werden können. Noch bleibt jedoch ein effektives Durchsuchen der DNA-Sequenz-Datenbanken auf diese beiden Modell-Pflanzen beschränkt. In allen anderen Arten bleibt eine aufwendige Suche in genomischen DNA-Banken bis auf weiteres die unerläßliche Methode, um einen repräsentativen Satz an Mikrosatelliten-Marker identifizieren zu können.

4.5 Optimierung der Mikrosatelliten-Analyse für die Massenproduktion

Neben der Überprüfung der Mikrosatelliten-Primerpaare auf ihre Tauglichkeit für die PCR sollte die Anwendung der Methode für alle Primerpaare vereinfacht werden, damit eine spätere Massenanalyse mit diesen Mikrosatelliten-Primerpaaren innerhalb des ausgewählten Raps- und *Brassica*-Sortimentes, sowie für die Kartierung von SSR-Loci durchgeführt werden konnte. Außerdem sollen die Mikrosatelliten-Marker für beliebige

Züchtungsprogramme und in der Grundlagenforschung Anwendung finden. Hierfür müssen sie leicht in anderen Laboratorien etablierbar sein.

HUGHES schlug 1993 zur Vereinfachung der Anwendung von Mikrosatelliten-Markern vor, die Annealing-Temperaturen für alle SSR-Primer möglichst niedrig zu halten. Die Entstehung von unspezifischen Nebenbanden sei weniger durch zu niedrige Annealing-Temperaturen als durch zu hohe Konzentrationen an Template-DNA und zu viele Zyklen in der PCR verursacht. Zur Optimierung der Massenanalyse sollte jedoch die DNA-Konzentration als Ausgangsbasis für die nachfolgende PCR-Reaktion für alle Ansätze konstant gehalten werden. Ergebnisse aus dieser Arbeit haben gezeigt, daß eine Erniedrigung des Ta-Wertes bei gleichbleibenden Mengen an Ausgangs-DNA und unveränderter Zyklen-Zahl bei einigen SSR-Primern zu unspezifischen Banden führen konnte. Aus diesem Grund wurden die SSR-Primerpaare in 3 Gruppen mit unterschiedlichen Annealing-Temperaturen aufgeteilt. Diese Temperaturen lagen bei 50 °C, 55 °C und 58 °C, wobei die größte Gruppe der SSR-Primerpaare bei einem Ta-Endwert von 55 °C amplifiziert werden konnte.

Um einheitliche und reproduzierbare Ergebnisse bei Massenanalysen zu erlangen, war es außerdem erforderlich, qualitativ gleichwertige Lösungen und Chemikalien zu verwenden. Hier erwiesen sich die „ReproSet High Resolution“ Gele als vorteilhaft, weil sie in vorgefertigten Lösungen mit geeigneter Gießvorrichtung vorlagen und durch UV-Licht schneller auspolymerisierten. Außerdem standen durch die Verwendung vorgefertigter Lösungen qualitativ gleichwertige Gele zur Verfügung. Dieses Gel-System konnte außerdem 3 bis 4mal wiederverwendet werden, wodurch die Probenzahl pro Gel erhöht werden konnte. Dadurch verringerte sich der Zeit- und Kosten-Aufwand erheblich.

Nach der Optimierung der PCR und der Auftrennung auf Polyacrylamid-Gelen wurden die Größen der Amplifikationsprodukte der Mikrosatelliten-Primer im „Screening“ mit 38 Rapssorten bestimmt. Durch die genaue Berechnung dieser Größen, die Abstimmung mit gemeinsamen internen Standards und einer gemeinsamen Annealingtemperatur (BROWN et al. 1996) konnte ein Großteil des nachfolgenden Screenings in den *Brassica*-Arten im Multiplexing-Verfahren (2 bis 3 SSR-Primer zusammen in einer PCR-Reaktion) durchgeführt werden (Abb. 3.10). Wenn die Primer keinen einheitlichen

Ta-Wert aufwies, wurde auf das Multiloading-Verfahren (gemeinsames Auftragen von 2 bis 3 PCR-Reaktionen) zurückgegriffen (Abb. 3.9). Beide Methoden erbrachten wiederum eine Zeit- und Kostenersparnis. Eine weitere Voraussetzung für die Durchführung des Multiplexings oder Multiloadings war, daß die Banden nach BROWN et al. (1996) nicht „zu schwer auswertbar“ sind. Als zusätzliche Bedingung wurde aufgeführt, daß durch die Primer keine „Kreuz-Reaktionen“ – eventuell durch eng gekoppelte Mikrosatelliten oder durch Sequenzhomologien – entstehen durften. Bei keiner der in dieser Arbeit durchgeführten Multiplex-Analysen konnten zusätzliche unspezifische Banden nachgewiesen werden, so daß dieses Problem beim Raps wohl eher eine untergeordnete Rolle bei der Kombination mehrerer Primerpaare miteinander spielt. Die Möglichkeit dieses Problems sollte aber bei jeder neuen Kombination von Markern berücksichtigt werden.

Das Multiplexing-Verfahren bringt in Mikrosatelliten-Marker-Analysen die höchste Effizienz beim Einsparen von Zeit und Kosten und wird in der Literatur als ultimatives Ziel bei der Massenanalyse in Züchtungsfragen mit Mikrosatelliten-Markern gesetzt (AKKAYA et al. 1995). Hier wurden 1996 von BROWN et al. vorgeschlagen, daß 4 bis 8 Loci pro Gel und nach AKKAYA et al. (1995) sogar 10 bis 20 Loci in einem Gel analysiert werden könnten. Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit mit Raps-Mikrosatelliten zeigten jedoch, daß hier eine weitaus niedrigere Grenze anzusetzen ist, weil SSR-Primerpaare im amphidiploiden Raps dazu neigen, mehrere Loci zu amplifizieren. Die Amplifikationsprodukte der SSR-Marker zeigen in den Gelen vielfach sog. „Stotterbanden“ (um eine Core-Einheit verkürzte Amplifikationsprodukte), die wohl durch „Slippage“-Ereignisse in der PCR verursacht werden (HUGHES 1993). Weiterhin können Allele der Mikrosatelliten-Marker bis zu 50 bp in ihrer Größe variieren (SENIOR und HEUN 1993). Der Auswertungsbereich der Gele in den in dieser Arbeit zugrunde liegenden Analysen lag bei maximal 278 bp (von 72 bis 349 bp). Damit die Analysen leicht auswertbar bleiben, sollte die Anzahl zu untersuchender Loci von 6 nicht überschritten werden, wobei die Spannbreite der Polymorphismen der Loci vorher in Einzelanalysen genau definiert sein muß. Hier sollte auch erwähnt werden, daß nicht alle Primerpaare zum Multiplexen oder Multiloading geeignet sind. SSR-Primerpaare mit zu komplexen Bandenmuster müssen hiervon, wie auch von BROWN et al. 1996 vorgeschlagen, ausgenommen werden.

In dieser Arbeit wurden einige SSR-Analysen zusätzlich auf hoch auflösenden 5%igen Metaphor-Agarose-Gelen untersucht. Unterschiede von nur 2 bp lassen sich auf Agarose-Gelen nur unzureichend auftrennen und können dadurch zu fehlerhaften Auswertungen führen. Dieses Problem wurde ebenfalls in der Literatur mehrfach angesprochen (HUGHES 1993, SENIOR und HEUN 1993, BELL und ECKER 1994, AKKAYA et al. 1995, BROWN et al. 1996). Eine genauere Alternative ist die Auftrennung der PCR-Produkte, entweder auf 6 bis 10%igen Polyacrylamid-Gelen (MORGANTE und OLIVIERI 1993, SENIOR und HEUN 1993, BELL und ECKER 1994, MAUGHAN et al. 1995, BROWN et al. 1996, PROVAN et al. 1996) oder in einer Kapillar-Elektrophorese (AKAGI et al. 1997, DEVEY et al. 1999, BUTCHER et al. 2000).

4.6 Zuordnung der Amplifikationsprodukte zu genetischen Loci

SSR-Marker wurden oft als „1-Locus-Marker“ bezeichnet (AKKAYA et al. 1995, BELL und ECKER 1994). Für diploide Pflanzengenome trifft diese Aussage in den meisten Fällen zu. Andere Autoren haben dagegen bei Analysen einiger ihrer SSRs mehrere Amplifikationsprodukte pro SSR-Primerpaar identifiziert. Dies wurde unter anderem in *Arabidopsis thaliana* (BELL und ECKER 1994), *Beta vulgaris* (MÖRCHEN et al. 1996), *Triticum aestivum* (MA et al. 1996), *Solanum tuberosum* (PROVAN et al. 1996), *Quercus petraea* (STEINKELLNER et al. 1997) und *Elymus caninus* (SUN et al. 1998) beobachtet.

Auch für *Brassica napus* wurde bereits beschrieben, daß einige SSR-Primerpaare mehrere PCR-Produkte amplifizierten (LAGERCRANTZ et al. 1993, KRESOVICH et al. 1995, UZUNOVA und ECKE 1999). In dieser Arbeit lag die Anzahl an Amplifikationsprodukten pro Primerpaar bei 1 bis 7. Davon wiesen 49 SSR-Primerpaare also 43,4% mehr als ein Amplifikationsprodukt auf. Das amphidiploide Raps-Genom setzt sich aus den Genomen von *Brassica rapa* (syn. *campestris*) (A-Genom, haploider Chromosomensatz: $n = 10$) und *Brassica oleracea* (C-Genom, $n = 9$) zusammen und besitzt damit zwei homologe Genome. So ist es durchaus möglich, daß einzelne Mikrosatelliten-Primerpaare in dem amphidiploiden Raps 2 PCR-Produkte amplifizieren können, die homologe Regionen im A- und C-Genom repräsentieren.

Zahlreiche Studien haben zudem bewiesen, daß es im Laufe der Phylogenie im Pflanzenreich diverse Duplikationsereignisse gab, bei denen ein Großteil des Genoms vervielfacht wurde (VAN DEYNZE et al. 1995). Dabei soll es zu Verdoppelungen kleinerer Regionen bis hin zu ganzen Chromosom-Abschnitten gekommen sein. Frühe RFLP-Analysen bei verschiedenen *Brassica*-Arten zeigten, daß die verwendeten Sonden in der Regel mit mehreren Loci hybridisieren, die häufig in konservierten Blöcken auf verschiedenen Chromosomen angeordnet sind (SONG et al. 1990, SLOCUM et al. 1990). Eine hochauflösende Kartierung in *Brassica nigra* zeigte dann, daß das B-Genom im wesentlichen aus 8 Segmenten besteht, die jeweils dreifach wiederholt, in unterschiedlichen Kombinationen, auf den 8 Chromosomen vorliegen. Dies hat zu der Hypothese geführt, daß das B-Genom aus einem hexaploiden Vorläufergenom entstanden ist, das durch Umlagerung von homologen Segmenten wieder zu einem (sekundär) diploiden Genom wurde (LAGERCRANTZ und LYDIATE 1996). Ein Vergleich von *Brassica rapa* (A-Genom) mit *Brassica oleracea* (C-Genom) ergab, daß beide Genome von dem gleichen Vorläufergenom abgeleitet sind, das „Rearrangement“ der genomischen Segmente aber unterschiedlich verlaufen ist (LAGERCRANTZ und LYDIATE 1996). Dies macht deutlich, daß locuspezifische Primerpaare wie die der Mikrosatelliten aufgrund dieser Genomstruktur durchaus auch mehr als zweimal im Genom ansetzen und so ein Bandenmuster, bestehend aus Amplifikationsprodukten mehrerer homologer Loci, produzieren können (in der vorliegenden Arbeit bis zu 7).

MA et al. (1996) erkannten, daß einige PCR-Produkte in Weizen unabhängig voneinander Polymorphismen aufwiesen, die als dominante Marker ausgewertet werden mußten. UZUNOVA und ECKE hatten 1999 im Raps ein unterschiedliches Verhalten zweier Loci beschrieben, die von einem Primerpaar nachgewiesen wurden. Denn hier zeigte ein Locus ein monomorphes Verhalten, während der andere polymorph war. Im größten Teil der Literatur werden mehrfache Bandenmuster zwar erwähnt, aber deren Verwendung und Auswertung nicht weiter erläutert (KRESOVICH et al. 1995, PROVAN et al. 1996, STEINKELLNER et al. 1997).

Eine Auswertung mehrfach auftretender polymorpher Amplifikationsprodukte pro SSR-Primerpaar wird zusätzlich erschwert, weil weder geklärt ist, welches der von einem

Primerpaar produzierten Amplifikationsprodukte vom spezifischen Mikrosatelliten-Locus stammt oder ob alle amplifizierten Loci einen Mikrosatelliten besitzen, noch um welche Art Sequenz-Homologien (SENIOR und HEUN 1993) es sich handelt, die zu den multiplen Amplifikationsprodukten führen. PROVAN et al. sequenzierten 1996 polymorphe und monomorphe Banden aus einem SSR-Primerpaar und konnten nachweisen, daß die polymorphen Banden Mikrosatelliten mit mehreren Längenvarianten enthielten. Bei den monomorphen Banden fehlte dagegen der Mikrosatellit. Die Autoren führen das Auftreten multipler Banden auf die Anwesenheit von Genfamilien zurück. Im amphidiploiden Raps sind derartige Studien bisher nicht unternommen worden.

Die in dieser Arbeit entwickelten SSR-Primer, die mehrere Loci amplifizierten, enthielten unter anderem, wie bei UZUNOVA und ECKE 1999 beschrieben, polymorphe und monomorphe Amplifikationsprodukte. Andere zeigten im Raps-Sortiment nur polymorphe Loci, mit unterschiedlichem Verhalten. Mehrere Sequenzvergleiche SSR-haltiger Loci haben gezeigt, daß die Ursache des Auftretens polymorpher Loci nicht nur durch „Slippage“-Ereignisse im Mikrosatelliten selbst, sondern auch durch Insertionen und Deletionen in den flankierenden Regionen des SSRs verursacht werden können (BLANQUER-MAUNONT und CROUAU-ROY 1995, GARZA et al. 1995). Um hier eine endgültige Klärung zur Definition eines SSR-Locus erreichen zu können, reichen reine PCR-Analysen nicht aus. Hier müßte jedes Allel eines Locus sequenziert werden, um zu erkennen, wo die Veränderung in der DNA-Sequenz auftrat und ob es sich in allen Fällen um SSR-Loci handelt oder ob in einer homologen Sequenz der Mikrosatellit durchgehend fehlt. Erst dann kann eine einheitliche Definition eines SSR-Locus und damit eine einheitliche Auswertung solcher SSR-Primer mit mehreren Amplifikationsprodukten vorgenommen werden.

Hauptziel bei der Identifizierung von SSR-Markern ist jedoch, polymorphe Loci zu erkennen, um diese als genetische Marker in der Züchtung, für die systematische Einteilung von Organismen, zu phylogenetischen und/ oder Syntänie-Studien verwenden zu können. Aus diesem Grund wurden, in Anlehnung an vorangegangene Untersuchungen von UZUNOVA und ECKE (1999), alle in dieser Arbeit identifizierten Amplifikationsprodukte, die von verschiedenen Genom-Orten stammten, als getrennte, voneinander unabhängige und gleichwertige Loci behandelt. Dabei war es unerheblich,

ob diese Loci den ursprünglichen Mikrosatelliten enthielten oder nicht. Ein Locus konnte dadurch von anderen unterschieden werden, daß die Amplifikationsprodukte geeignete Größenunterschiede (z. B. größer als die Variabilität durch den SSR bedingt sein könnte) zueinander zeigten. Außerdem war anhand der Aufspaltung der Allele ein Locus erkennbar. Dies wurde durch die Tatsache erleichtert, daß es sich bei dem untersuchten Rapsmaterial im wesentlichen um Linien-Sorten handelte, die nur eine geringe Restheterozygotie enthielten und daher für die meisten Marker-Loci homozygot sind.

In der Literatur werden SSR-Marker als codominant auswertbare molekulare Marker bezeichnet (BLAIR und MCCOUCH 1997). Dieses setzt voraus, daß beide Allele eines Locus erkennbar sind. Von den in dieser Arbeit identifizierten SSR-Primern wiesen jedoch 64 in einzelnen Genotypen des untersuchten Raps-Sortiment keine Amplifikationsprodukte auf. Durch Wiederholung der PCR-Analyse konnte hier ausgeschlossen werden, daß dieses Ereignis durch Fehler in der Analyse zustande gekommen war. Das Fehlen von Amplifikationsprodukten, d. h. SSR-Marker mit „Nullallelen“, wurde bereits mehrfach beschrieben. Sie kommen z. B. bei *Arabidopsis thaliana* (BELL und ECKER 1994), der Sojabohne (MORGANTE et al. 1994), dem Mais (TARAMINO und TINGEY 1996), der Gerste (DAVIERWALA et al. 2000) und bei Akazien (BUTCHER et al. 2000) vor, aber auch in *Brassica* sind sie mehrfach beobachtet worden (LAGERCRANTZ et al. 1993, UZUNOVA und ECKE 1999). Bei den 4 von KRESOVICH et al. 1995 untersuchten SSR-Primerpaaren zeigten 3 in bestimmten Allelen kein PCR-Produkt, was verdeutlicht, daß das Vorkommen solcher „Nullallele“ besonders in *Brassica*-Arten keine Ausnahmeerscheinung darstellt. Die Entstehung von „Nullallelen“ könnte darauf zurückzuführen sein, daß dieser Locus entweder in bestimmten Genotypen durch eine Deletion verloren ging oder die Region, an der der Primer normalerweise ansetzt, so verändert vorlag, daß ein Annealing in der PCR-Reaktion nicht mehr möglich war (DAVIERWALA et al. 2000). Nachteilig bei der Auswertung von „Nullallelen“ ist, daß hier eventuell vorkommende mehrfache Veränderungen nicht erkennbar sind. Deswegen wurden von BELL und ECKER (1994) SSR-Primerpaare, die „Nullallele“ produzierten, nicht weiter untersucht. In dieser Arbeit fanden dagegen diese SSR-Primer als dominante Marker in der PCR-Analyse und sogar in der darauf folgenden Kartierung weiterhin Verwendung.

Hilfreich bei der Unterscheidung von „Nullallelen“ und fehlerhaften Analysen waren oftmals zusätzlich auftretende, oft monomorphe Amplifikationsprodukte ein und desselben Primerpaares. Wenn durchgehend Banden erschienen, andere PCR-Produkte dieses Primerpaares jedoch fehlten, konnte es sich nicht um experimentelle Fehler handeln. Hier wurde das „Nullallel“ als solches sofort erkannt. Grundsätzlich wurden alle Primer-Analysen wiederholt, um die Fehlerquote der Auswertungen möglichst gering zu halten.

4.7 Sortenübergreifende Analyse anhand der Mikrosatelliten-Marker

Die Analyse von 113 SSR-Primerpaaren in den 38 Raps-Sorten ergab 199 identifizierte Loci. Die Anzahl der SSR-Primerpaare, die nur ein Amplifikationsprodukt zeigten, lag bei 52 (Tab. 3.8), während 61 Mikrosatelliten-Primer 2 bis 7 Loci aufwiesen.

Der Polymorphiegrad lag bei 61,8% und war damit höher als bei RAPD-Markern (MAILER et al. 1994). Die Zahl der „Nullallele“ lag bei 34. Da mehrere polymorphe Loci zusammen oder polymorphe und monomorphe Loci in einer SSR-Primerpaar-Analyse kombiniert vorkamen, lag der Polymorphiegrad der SSR-Primerpaare im Raps bei 70,8%, was einer Zahl von 80 Mikrosatelliten-Primern entsprach (Tab. 3.11).

Die Variabilität der Allele lag zwischen 2 und 42 bp und somit in der von SENIOR und HEUN (1993) beschriebenen Spanne von 50 bp. Dabei zeigten von den 123 polymorphen Loci lediglich 36 Unterschiede in den Allelen von mehr als 2 bp, was einer „Core-Einheit“ (GRIST et al. 1993) entspricht, wodurch sich der niedrige Mittelwert von knapp 8 bp erklären läßt.

Die Anzahl der Allele in diesen 123 polymorphen Loci lag zwischen 2 und 11. Dabei zeigten 1/3 der Loci nur 2 Allele und 1/2 der Loci 3 bis 7 Allele (Tab. 3.10). Mehr als 8 Allele pro Locus waren mit unter 6% selten. Daraus resultiert eine niedrige Allelzahl von 3,7 Allelen pro Locus. In *Sorghum* und *Arabidopsis* wurden vergleichbare Allelzahlen identifiziert (BROWN et al. 1996, (2 bis 6 bei 30 SSRs) BELL und ECKER 1994) (*Arabidopsis* 2 bis 6 Allele bei 30 SSRs).

Untersuchungen von 34 SSRs beim Mais mit 1 bis 11 Allelen und einem Mittelwert von 6,8 (TARAMINO und TINGEY 1996) zeigten einen etwas höheren Polymorphiegrad. Das gleiche gilt für die Pappel mit 5 bis 11 Allelen bei 14 SSRs und einem Mittelwert von 7,3 (DAYANANDAN et al. 1998).

Hohe Polymorphieraten ergaben sich besonders bei der Sojabohne mit bis zu 26 Allelen bei nur 7 SSRs (RONGWEN et al. 1995). Daraus wird ersichtlich, daß der Polymorphiegrad artenspezifisch stark variiert. Innerhalb der Arten können die gefundenen Werte unterschiedlich ausfallen, je nach Anzahl und Auswahl der Pflanzen-Genotypen, wie das Beispiel der Sojabohne zeigt. Hier lag der Mittelwert der Allelzahl einerseits bei 6,5 mit nur 2 bis 8 Allelen bei 7 SSRs (MORGANTE und OLIVIERI 1993, MORGANTE et al. 1994), während bei Untersuchungen von MAUGHAN et al. (1995) in 5 SSRs sehr hohe Allelzahlen von 5 bis 21 Allelen gefunden wurden. In Pflanzen mit hoch polymorphen SSR-Markern ist dadurch die Sortenidentifizierung deutlich vereinfacht, was Untersuchungen in der Kartoffel und dem Reis bestätigen. Bei den Analysen in der Kartoffel konnten aufgrund der hohen Allelvarianz alle 18 Sorten mit nur einem SSR-Primerpaar identifiziert werden (PROVAN et al. 1996). AKAGI et al. (1997) konnten 56 Reislinien mit 5 SSRs eindeutig unterscheiden.

Im Raps wurden bisher keine Untersuchungen über die Möglichkeit einer Sortenidentifizierung mit SSR-Markern durchgeführt. Hier lagen bisher zu wenige Ergebnisse mit untersuchten Mikrosatelliten-Markern vor. KRESOVICH et al. (1995) untersuchten 7 Raps-SSRs, von denen lediglich 2 in 3 Raps-Linien polymorph waren und konnten dementsprechend nur 1 bis 2 Allele pro Locus identifizieren. Bei LAGERCRANTZ et al. (1993) konnten ebenfalls bei nur 4 untersuchten SSR-Primern 1 und 2 Allele in 15 Linien identifiziert werden. Bei UZUNOVA und ECKE 1999 stieg die Allelzahl bei 8 SSR-Loci auf 1 bis 3 in 31 Raps-Sorten. In der vorliegenden Arbeit wurden 199 Loci in 38 Raps-Genotypen analysiert, wodurch sich die Zahl der Allele pro Locus auf 1 bis 11 erhöhte. Obwohl hier, verglichen mit anderen Pflanzenarten eine geringere Polymorphierate vorlag, zeigte sich, daß es bei der Bestimmung der Anzahl an Allelen auf die große Auswahl an SSR-Loci und die Anzahl und Verwandtschaft untersuchter Linien ankommt.

Trotz dieser niedrigen Allelzahl konnten alle 38 Genotypen des untersuchten Sortiments mit Hilfe von 25 SSR-Primerpaaren eindeutig identifiziert werden, weil insgesamt 76 Allele in nur einer Raps-Sorte vorkamen. Dies spiegelt die niedrige Allelfrequenz mit einem Mittelwert von 0,27 und einem minimalen Wert von 0,03 wieder.

Einschränkend ist zu erwähnen, daß das Sortiment der untersuchten Raps-Linien aus einem breiteren Material von mit RFLP-Markern voruntersuchten Sorten stammt (KNAAK 1996). Hier wurden anhand der erstellten genetischen Distanzen Sorten ausgewählt, die verwandtschaftlich möglichst weit voneinander entfernt waren und das Material in der gesamten Breite repräsentieren. Bei enger verwandten Sorten würde die Anzahl Sorten-spezifischer Allele abnehmen und daher eine größere Zahl an SSR-Markern für die Sortenidentifizierung benötigt werden.

Bei den Analysen der SSR-Marker in den 38 Raps-Sorten fielen weiterhin 21 Loci auf, die sich in den Winterraps und Sommerraps-Sorten unterschieden (Tab. 3.16). Dies ließ sich jedoch durch die getrennte Berechnung der Allelfrequenzen in diesen beiden Gruppen nicht aufzeigen, denn hier war kein Einfluß auf die Allelfrequenz erkennbar. Die Mittelwerte lagen bei 0,31 für den Winterraps und 0,32 für den Sommerraps (Kap. 3.6.2). Diese Unterschiede tauchten zufällig auf, so traten z. B. im Sommerraps monomorphe Loci auf, die im Winterraps Polymorphismen aufwiesen und umgekehrt. Das unterschiedliche Verhalten einzelner SSR-Loci in beiden Sortimentgruppen hob sich damit gegenseitig auf.

Aufbauend auf den anhand der Mikrosatelliten-Marker geschätzten genetischen Distanzen konnten dagegen in der Clusteranalyse (Abb. 3.8) Sommer- und Winterraps als 2 klar getrennte Gruppen voneinander unterschieden werden. Hier bildete der australische Sommerraps ‚Taparoo‘ eine Ausnahme, denn er wurde in das Sortiment des Winterraps als eigenständige Untergruppe integriert, wobei diese Sorte die größte genetische Distanz zum Winterraps aufweist. Die asiatische Sorte ‚Italy‘ liegt dieser Raps-Linie am nächsten. Diese Ergebnisse stehen in guter Übereinstimmung mit den Resultaten von DIERS und OSBORN (1994). Diese Autoren konnten bei Untersuchungen mit RFLP-Markern ebenfalls beobachten, daß Winter- und Sommerraps-Genotypen 2 klar getrennte Gruppen bilden. Asiatische und australische Raps-Genotypen zeigten z. T. hohe genetische Distanzen zu beiden Gruppen, waren selbst

also weniger klar gruppiert und lagen je nach Genotyp näher beim Winter- oder Sommerraps.

Unter den Winterraps-Genotypen zeigt ‚Mansholt‘ den größten Abstand zu den anderen Winterraps-Sorten. Diese Sorte war bereits bei den von KNAAK (1996) durchgeführten RFLP-Analysen zur Bestimmung von genetischen Distanzen beim Raps als vom Winterraps deutlich abgegrenzte Sorte aufgefallen. Eine weitere Übereinstimmung zwischen der hier durchgeführten Clusteranalyse und der Analyse von KNAAK (1996) ist die Einordnung der Sorten ‚Sollux‘ und ‚Express‘ sowie ‚Liberator‘ und ‚Score‘, die in beiden Untersuchungen jeweils einer gemeinsamen Gruppe zugeordnet wurden. Weiterführende Vergleiche sind schwierig, da das in beiden Untersuchungen verwendete Sortenmaterial nur z. T. übereinstimmt.

Dennoch zeigen diese Ergebnisse der Clusteranalysen, die auf dem Einsatz unterschiedlicher Marker-Typen beruhen (RFLP-Marker und SSR-Marker), daß die von PLASCHKE et al. (1995) propagierte effiziente Nutzung von SSR-Markern für genetische Distanz-Analysen unterstützt werden kann. Die in dieser Arbeit entwickelten SSR-Marker wurden bereits in ein Set, bestehend aus Mikrosatelliten-Markern für Züchtungszwecke der Saatenunion (Leopoldshöhe) integriert (FÖRSTER et al. 1999).

4.8 Verwendung der Mikrosatelliten-Marker für artenübergreifende Analysen

In die Schätzungen zur genetischen Distanzanalyse (Abb. 3.8) wurde neben dem Rapsortiment zusätzlich eine kleine Auswahl an Sorten integriert, die die A-, C-, B-, BA- und BC-Genome des U'schen Dreiecks repräsentierten (Anhang B). In der Clusteranalyse konnten Verwandtschaftsverhältnisse der diploiden Genome aufgrund der Auswahl der das diploide Genom darstellenden Sorten nur angedeutet werden. Anhand der großen genetischen Distanzen zwischen dem B- und A-Genom sowie dem B- und C-Genom kann angenommen werden, daß *Brassica nigra* phylogenetisch weiter entfernt von *Brassica rapa* und *Brassica oleracea* ist als die beiden zuletzt genannten Arten untereinander. Dies stimmt mit RFLP-Studien überein, die ebenfalls gezeigt

haben, daß *Brassica rapa* und *Brassica oleracea* enger miteinander verwandt waren als mit *Brassica nigra* (SONG et al. 1988).

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Clusteranalyse unterstützt außerdem die Abstammungshypothese des Raps und läßt eine Verwandtschaft zum diploiden A- und C-Genom erkennen, aus denen sich das amphidiploide Rapsgenom zusammensetzt (U 1935), (SONG et al. 1988). In diesem Dendrogramm (Abb. 3.8) wird eine engere Verwandtschaft des Raps zu *Brassica rapa* (A-Genom) als zu *Brassica oleracea* (C-Genom) wiedergegeben. Diese Analysen beruhen jedoch auf nur je 3 Sorten, die eines der beiden diploiden Genome repräsentieren und können daher keine allgemein gültigen Aussagen über die Abstammung des amphidiploiden Raps aus den einzelnen diploiden Vorfahrgenomen machen. Wären für die Schätzungen der genetischen Distanzen andere diploide Sorten gewählt worden, so könnte aus der Clusteranalyse ein anderes Ergebnis resultieren. Um hier genauere Studien durchführen zu können, müßten Analysen in einem breiteren diploiden Sortiment unternommen werden.

Dagegen konnten bei Herkunftsanalysen der SSR-Loci im Raps und ihren Ausgangs-
genomen eine gleichmäßige Verteilung der Loci aus dem A- und C-Genom nachgewiesen werden. Hier konnte bei 20 Loci der Ursprung aus einem der Genome eindeutig zugeordnet werden, von denen 10 aus dem A- und 10 aus dem C-Genom stammten. Dies zeigt, daß die in der Clusteranalyse dargestellte engere Verwandtschaft des amphidiploiden Raps-Genoms zum A-Genom durch die geringe Zahl untersuchter diploider Sorten hervorgerufen wurde.

Bei der artenübergreifenden Analyse der SSR-Loci zur Bestimmung der Polymorphierate in den untersuchten *Brassica*-Arten, wurden 11 Loci identifiziert, die im Raps-Genom nicht lokalisiert wurden. Diese zusätzlichen Loci lagen je dreimal nur im A-Genom, im B-Genom und im C-Genom. Ein weiterer Locus konnte jeweils im A- und C-Genom und im B- und C-Genom identifiziert werden (Tab. 3.18). Das Auftreten zusätzlicher Loci tritt damit in den 3 untersuchten *Brassica*-Genomen gleichmäßig auf. Dabei stieg der Anteil polymorpher Loci aufgrund der höheren genetischen Diversität des untersuchten Materials erwartungsgemäß auf 90,5% (Tab. 3.19). Bei den ebenfalls auf SSRs beruhenden ISSR-Fingerprinting waren 96% der untersuchten Banden in Brassicaceen polymorph (MARTIN und SANCHEZ-YELAMO 2000). Die Polymor-

phierate liegt somit innerhalb der untersuchten *Brassica*-Arten bei SSRs höher als bei RFLPs, die nur einen Polymorphiegrad von 77,7% zeigten (SONG et al. 1990).

Aus der Literatur sind bisher jedoch keine Ergebnisse bei *Brassica*-Arten mit einer entsprechend hohen Anzahl an locuspezifischen Mikrosatelliten-Markern bekannt. LAGERCRANTZ et al. berichteten aber bereits 1993, daß alle 4 untersuchten SSR-Primer in den 15 amphidiploiden *Brassica napus*-Sorten sowie in dem Set der ebenfalls je 15 Sorten zählenden diploiden *Brassica rapa* und *Brassica oleraceae*-Sorten Polymorphismen zeigten. Bei diesen Studien konnten jedoch nur mit einem Primerpaar PCR-Produkte in *Brassica nigra* und damit in allen untersuchten *Brassica*-Arten amplifiziert werden. Die erhöhte Anzahl an Fehlamplifikationen stimmt mit den Ergebnissen dieser Arbeit überein. Fast 54% der hier untersuchten Primerpaare ergaben in *Brassica nigra* ebenfalls keine Amplifikationsprodukte. RFLP-Analysen ergaben in *Brassica* ebenfalls weniger Banden im B-Genom als im A- und C-Genom (SONG et al. 1988).

4.9 Kartierung der Mikrosatelliten-Marker in der RFLP-Kopplungskarte von ‚Mansholt‘ und ‚Samourai‘

Von den 113 zur PCR-Analyse verwendeten SSR-Primerpaaren zeigten insgesamt 40 SSR-Primer in den Linien ‚Mansholt‘ und ‚Samourai‘ Polymorphismen. Der Polymorphiegrad der SSR-Primer lag dementsprechend in diesen beiden Kartierungslinien bei 35,4%. Dies entspricht dem Anteil informativer RFLP-Sonden von 35,7% (mit *EcoRI* geschnittener DNA) bzw. 37,2% (mit *HindIII* geschnittener DNA) (UZUNOVA et al. 1995). WU und TANKSLEY (1993) sowie YANG et al. (1994) fanden beim Reis einen höheren Polymorphiegrad bei Mikrosatelliten als bei RFLPs. Dies scheint sich zu relativieren, wenn es sich um Zuchtlinien mit geringer genetischer Diversität handelt (AKAGI et al. 1997).

Da auch diese SSR-Primerpaare z. T. mehrere Loci amplifizierten standen für die Kartierung 50 polymorphe Loci zur Verfügung. Davon wurden 33 in die RFLP-Kopplungskarte von UZUNOVA et al. (1995) integriert. Diese befanden sich in 12 der 20 Kopplungsgruppen. Die Verteilung der Mikrosatelliten-Loci war dabei zufällig, was

daran zu erkennen ist, daß diese Marker unterschiedliche Positionen in den Kopplungsgruppen einnahmen (Abb.3.13). Randständige SSR-Marker vergrößerten dabei die Kopplungsgruppen drastisch (Kopplungsgruppe 16 und 19). Die Verlängerung dieser Kopplungsgruppen liegt durchaus im Bereich des möglichen, da mit der ursprünglichen RFLP-Karte nicht das gesamte Genom abgedeckt wurde (UZUNOVA et al. 1995). Die integrierten Mikrosatelliten-Marker konnten dadurch z. T. Bereiche abdecken, die durch die RFLP-Marker bisher nicht identifiziert wurden, was dafür spricht, daß es von Nutzen ist, SSRs als Zusatzmarker in bestehende Kopplungskarten zu integrieren.

Die Kopplungskarte weist auch nach dem Integrieren der SSR-Marker 20 Kopplungsgruppen auf. Das amphidiploide Raps-Genom besitzt jedoch nur 19 Chromosomen. Die Zusammenführung zweier Kopplungsgruppen zu einem entsprechenden Chromosom konnte auch mit Hilfe der SSR-Marker nicht erreicht werden, obwohl diese zusätzliche Bereiche aufzeigt. Daraus wird erkennbar, daß auch mit den integrierten SSR-Markern die Kopplungskarte nicht alle Bereiche des Genoms abdeckt.

Durch die Auswertung aller SSR-Loci eines Primerpaares können Rückschlüsse auf eventuell erfolgte Duplikationen im *Brassica napus*-Genom und eventuelle Homologie-Beziehungen zwischen den beiden Ausgangsgenomen gezogen werden. So konnten 2 der 3 Loci aus MR163.2 kartiert und auf der Kopplungsgruppe 12 zentral (MR163.2a) und distal (oben) (MR163.2b) lokalisiert werden. Die anderen beiden Amplifikationsprodukte des SSR-Primers waren monomorph. Die Kartierung zweier SSR-Loci aus einem Primerpaar in derselben Kopplungsgruppe läßt den Schluß zu, daß sich ein Abschnitt der Kopplungsgruppe 12 dupliziert haben könnte. Diese Kopplungsgruppe zeigte einen weiteren Beweis für eine Verdoppelung: Im oberen Abschnitt dieser Kopplungsgruppe lag MR64b, während MR64c im oberen Teil der Kopplungsgruppe 1 kartiert werden konnte (MR64a war dagegen monomorph). In der Kopplungsgruppe 12 wurden zusätzlich von UZUNOVA 1994 Duplikationen gefunden. Hier zeigte die Kopplungsgruppe Homologien zur Kopplungsgruppe 17 und 13.

Der dritte SSR-Primer, von dem 2 amplifizierte Mikrosatelliten-Loci kartiert werden konnten, war MR13. Diese Loci lagen jeweils im oberen Abschnitt der Kopplungsgruppen 9 und 16.

In Verbindung der Herkunfts-Analysen mit den Kartierungen konnten außerdem erste Versuche zur Zuordnung der Kopplungsgruppen zum A- oder C-Genom unternommen werden. So konnten 2 der Loci, deren Herkunft bestimmt wurde, in die RFLP-Karte vom Raps integriert werden. Dabei handelte es sich einmal um die SSR-Marker MR51c und MR230, die auf den Kopplungsgruppen 15 und 16 liegen (Abb. 3.13). Da beide Marker dem A-Genom zugeordnet werden konnten, stammen die beiden dazugehörigen Kopplungsgruppen aus diesem Genom.

Diese Analysen zeigen, daß es wichtig war, in dem amphidiploiden Raps alle amplifizierten SSR-Loci aus einem Primerpaar gleichwertig zu analysieren (MA et al. 1996, UZUNOVA und ECKE 1999) und die SSR-Marker nicht nur als „1-Locus-Marker“ (im engsten Sinne) zu behandeln wie dies bei diploiden Arten, z. B. bei *Arabidopsis* (BELL und ECKER 1994) durchgeführt wurde. Hier wurde nur das stärkste Amplifikationsprodukt ausgewertet (AKKAYA et al. 1995).

4.10 Anwendung der SSR-Marker in der Pflanzenzüchtung

Wie bei *Arabidopsis* (BELL und ECKER 1994) und anderen diploiden Arten beschrieben, konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, daß SSR-Marker auch beim Raps den Vorteil haben, daß sie sehr häufig im Genom vorkommen und zufällig verteilt sind. Zudem weisen sie einen geeigneten Grad an Polymorphie auf, und ihre Analyse läßt sich leicht automatisieren (KRESOVICH et al. 1995), weil sie auf der PCR-Methode basieren. Deswegen sind sie besonders bei der markergestützten Selektion einsetzbar, bei der je nach Anwendung große Populationen und/ oder große Markerzahlen untersucht werden müssen. Zudem lassen sie sich leicht in anderen Laboratorien etablieren; so wurde ein Teil der in dieser Arbeit entwickelten Mikrosatelliten-Marker bereits für die Untersuchung der genetischen Distanzen und zur Sortenidentifizierung verwendet (FÖRSTER et al. 1999).

Aufgrund dieser Vorteile ist die Anwendung von SSR-Markern heute schon vielfältig: So wurden Mikrosatelliten-Marker für Qualitätsuntersuchungen im Saatgut von Reis (AKAGI et al. 1997) verwendet. Sie werden außerdem in der markergestützten Selektion (LIU et al. 1999) und in Populationsanalysen (AKAGI et al. 1997) genutzt. Auch

wenn die CA-Motive limitiert „clustern“ sollten (CONDIT und HUBBELL 1991, BUTCHER et al. 2000), so sind SSR-Marker doch hoch informativ (AKKAYA et al. 1992). Dieses „clustern“ bestimmter SSR-Motive konnte beim Raps nicht bestätigt werden.

Durch die Nutzung von SSR- und anderen Markern können Genom-Karten gleichmäßiger abgedeckt werden (UZUNOVA 1994), was einen weiteren Vorteil für marker-gestützte Selektionen oder vergleichende Genom-Studien darstellt.

Mikrosatelliten-Marker sind ein „exzellenter“ Zusatz für RFLPs und RAPDs. Sie eignen sich hervorragend für Abstammungsanalysen (AKKAYA et al. 1992) und können als Anker-Marker beim Abgleich von Karten verschiedener Populationen dienen (UZUNOVA et al. 1999). In dieser Arbeit konnte zudem gezeigt werden, daß SSR-Marker als ergänzende Marker für Genom-Studien verwendet werden können.

Der höhere Polymorphiegrad von Mikrosatelliten-Markern gegenüber den RFLP- oder RAPD-Markern (POWELL et al. 1996) konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch nur bedingt – und zwar über die gesamten *Brassica*-Arten – bestätigt werden. Je näher die untersuchten Sorten miteinander verwandt sind, desto eher gleichen sich die Raten polymorpher Markertypen. Es konnte hier aber gezeigt werden, daß SSR-Marker beim amphidiploiden Raps wie auch bei anderen diploiden Arten, z. B. beim Reis (PROVAN et al. 1996, AKAGI et al. 1997) sehr gut zur Sortenidentifizierung geeignet sind.

Weitere Einsatzmöglichkeiten sind Pollen-Studien (STEINKELLNER et al. 1997), horizontale Gen-Ausbreitung (BUTCHER et al. 2000), Studien zur Populationsdynamik (YANG et al. 1994), Gen-Diagnostik und Pyramidisieren von Resistenzgenen (BLAIR und MCCOUCH 1997). DAVIERWALA et al. (2000) waren der Meinung, daß konservierte SSR-Marker für vergleichende Kartierungen oder Syntanie-Studien sehr gut nutzbar seien, während hoch polymorphe Mikrosatelliten für die Kartierung und Selektion von Genen oder „quantitative trait loci“ (QTLs) für agronomisch bedeutsame Merkmale Verwendung finden sollten.

SUN et al. schlugen deswegen 1998 vor, daß Mikrosatelliten-Marker in Form von Primer-Sequenzen zwischen den Laboren ausgetauscht werden sollten. Die in dieser

Arbeit identifizierten, charakterisierten und kartierten SSR-Marker wurden in einer internationalen Zusammenarbeit unter der Führung von Celera AgGen, Davies, USA entwickelt. Sie stehen allen in diesem Projekt involvierten Arbeitsgruppen zur Verfügung. Hier wurden insgesamt 524 Mikrosatelliten-Primer untersucht, von denen alleine 141 SSR-Loci in die Raps-RFLP-Karte von UZUNOVA et al. (1995) integriert werden konnten (ECKE, nicht veröffentlicht).

4.11 Ausblick

Mikrosatelliten dienen bereits als Zusatz- oder Ersatz-Marker für andere aufwendigere oder weniger zuverlässige Markersysteme in zahlreichen Studien im Pflanzen- und Tierreich. Ihre Vorteile liegen in der leichten, schnellen und kostengünstigen Handhabung und Übertragbarkeit in andere Laboratorien. Die Entwicklung der SSR-Marker war dagegen sehr kosten- und zeitaufwendig, da der SSR-Locus zunächst durch Klonierung und Sequenzierung identifiziert werden mußte, um spezifische Primerpaare entwickeln zu können (KRESOVICH et al. 1995). Dies wird sich in der Zukunft ändern, wenn immer mehr Sequenzen öffentlich zur Verfügung stehen, wodurch das Suchen in DNA-Sequenz-Datenbanken nach SSRs höhere Ausbeuten ergeben wird. Hierzu tragen besonders die angefangenen Genom-Projekte und das bereits nahezu beendete *Arabidopsis*-Genom-Projekt bei. Aufgrund ihres hohen Auftretens im Genom stehen Mikrosatelliten-Marker im hohen Maße für Züchtungsstudien zur Verfügung, wobei nicht jeder SSR-Marker für alle Arten der Analysen verwendet werden kann (DAVIERWALA et al. 2000).

Um Mikrosatelliten auch für Genomstudien und markergestützte Selektionen effizient nutzen zu können, muß eine möglichst hohe Markerabdeckung erreicht werden (GRIST et al. 1993). Dies hat auch die vorliegende Arbeit gezeigt. Hier müßten für Genom-Analysen zahlreiche weitere kartierbare SSR-Marker entwickelt werden, da nur ein sehr geringer Prozentsatz der kartierten Marker auch Auskunft über die Herkunft der Loci geben.

Der zukünftige Einsatz von Mikrosatelliten als molekulare Marker wird einerseits in der Grundlagenforschung mit kartierten SSR-Markern für Genomanalysen und Syntänie-

Studien nah verwandter Arten liegen. Andererseits werden gut abgestimmte Sets leicht auswertbarer SSR-Marker mit allen Vorteilen dieser Marker für Massenanalysen (größtenteils Codominanz, Multiplexing in der PCR, mehrfache Beladungen der Gele, Analyse innerhalb eines Tages, automatisierte Analysen mittels Computer-Programmen) zusammengestellt, um diese für Züchtungszwecke (z. B. markergestützten Selektion von Resistenzgenen oder agronomisch wichtigen Merkmalen, Sortenidentifizierung, oder Hybridzüchtung) optimal nutzen zu können.

5 Zusammenfassung

Mit den Mikrosatelliten-Markern lassen sich mehrere Vorteile verschiedener molekularer Marker miteinander verknüpfen: Sie basieren zum Einen auf der leichten und schnellen Methode der PCR wie die RAPD-Marker, was sie ideal für den Einsatz in der Massenanalyse macht. SSR-Marker sind dabei jedoch zuverlässiger in ihren Analysen. Zum Anderen können sie wie die aufwendigeren RFLP-Marker in der Regel codominant ausgewertet werden. In dieser Arbeit wurden erstmals Untersuchungen zur Entwicklung eines größeren Sets an Mikrosatelliten-Markern im amphidiploiden Raps vorgenommen.

Dafür wurden aus einer genomischen DNA-Phagen-Bank GA- und CA-Motiv-haltige Mikrosatelliten isoliert und sequenziert. SSRs mit diesen beiden Motiven kamen ca. alle 105 kb vor. Da das GA-Motiv fünffach häufiger als das CA-Motiv identifiziert werden konnte, trat das GA-Motiv ca. alle 125 kb und das CA-Motiv ca. alle 630 kb im Genom auf.

An den flankierenden Regionen der SSRs wurden Primer für die PCR-Analyse gesetzt. Wenn eine dieser Regionen fehlte, wurde der Mikrosatellit selbst als Primer verwendet und durch spezifische Basen am 5'-Ende des SSRs verankert. Die Funktion der „Ankerprimerpaare“, sowie aller anderen hier entwickelten Primerpaare wurde in der PCR überprüft. Die PCR-Reaktion und Gelelektrophorese selbst wurde für die Nutzung in der Massenanalyse u. a. durch den Einsatz von „Multiplexing“- und „Multiloading“-Verfahren optimiert.

Bei der Analyse der SSR-Primerpaare im Raps wurden 1 bis 7 Loci pro Primerpaar detektiert. Das zeigt, daß die Definition des „1-Locus-Marker“ für SSRs nur für diploide Arten gelten kann. Im amphidiploiden Raps dagegen, bei dem zusätzlich zahlreiche Duplikationen innerhalb des Genoms nachgewiesen wurden, kann ein SSR-Primerpaar trotz seiner hohen Locus-Spezifität mehrfach im Genom ansetzen.

Im Raps zeigten 71% der charakterisierten SSR-Primerpaare Polymorphismen, wobei die Anzahl der „Nullallele“ in dieser Art sehr hoch ist. Aus diesem Grund konnten nicht alle SSR-Marker codominant ausgewertet werden. Aufgrund fehlender Amplifikationsprodukte in einigen Loci konnten hier nur dominante Auswertungen vorgenommen werden. Trotz der geringen Allelzahlen der Mikrosatelliten-Loci im Raps (1 bis 11) konnten alle 38 untersuchten Sorten mit Hilfe von 25 SSR-Markern identifiziert werden.

In der artenübergreifenden Analyse innerhalb der das U'sche Dreieck repräsentierenden Arten stieg der Polymorphiegrad der SSRs erwartungsgemäß auf über 90%, wobei die Anzahl nicht amplifizierter Loci mit abnehmendem Verwandtschaftsgrad zunahm. Die Analyse innerhalb der Arten ließ Rückschlüsse auf die Zuordnung einiger Loci des amphidiploiden Raps auf die diploiden Ausgangsgenome (A- und C-Genom) zu.

In dieser Arbeit wurde außerdem nachgewiesen, daß SSR-Marker für die Schätzung genetischer Distanzen geeignet sind, was der Vergleich mit Clusteranalysen, basierend auf RFLP-Markern, zeigt. Die anhand der berechneten genetischen Distanzen erstellte Clusteranalyse ließ eine eindeutige Trennung des Sommer- und Winterraps erkennen. Eine weitere Einteilung in Gruppen verwandter Sorten konnte ebenfalls vorgenommen werden.

Um SSR-Marker neben dem Einsatz in der Massenanalyse zu Züchtungszwecken auch in der Grundlagenforschung verwenden zu können, wurde ein Set, bestehend aus 33 SSR-Markern in eine von UZUNOVA et al. 1995 erstellten RFLP-Kopplungskarte integriert. Hier konnte, wie bereits für diploide Pflanzenarten bekannt, gezeigt werden, daß Mikrosatelliten auch im Raps gleichmäßig im Genom verteilt vorkommen. Durch die Verknüpfung der Kartierungsarbeiten mit den Herkunftsanalysen konnten 2 Kopplungsgruppen-Abschnitte dem A-Genom zugeordnet werden.

6 Literaturverzeichnis

- AKAGI, H., YOKOZEKI, Y., INAGAKI, A. und FUJIMURA, T. 1997: High polymorphic microsatellites of rice consist of AT repeats, and a classification of closely related cultivars with these microsatellite loci. *Theor. Appl. Genet.* **94**: 61 – 67.
- AKKAYA, M. S., BHAGWAT, A. A. und CREGAN, P. B. 1992: Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in Soybean. *Genetics* **32**: 1131 – 1139.
- AKKAYA, M. S., SHOEMAKER, R. C., SPECHT, J.E., BHAGWAT, A. A. und CREGAN, P. B. 1995: Cell biologie & molecular genetics: Integration of simple sequence repeat DNA markers into Soybean linkage map. *Crop Sci.* **35**: 1439 – 1445.
- ALBANI, M. C. und WILKINSON, M. J. 1990: Inter simple sequence repeat polymerase chain reaction for the detection of somaclonal variation. *Plant Breeding* **117**: 573 – 575.
- AMMER, H., SCHWAIGER, F.-W., KAMMERBAUER, C., GOMOLKA, M., ARRIENS, A., LAZARY, S. und EPPLEN, J. T. 1992: Exonic polymorphisms vs intronic simple repeat hypervariability in MHC-DRB genes. *Immunogenetics* **35**: 332 – 340.
- AYRES SIA, E., KOKOSKA, R. J., DOMINSKA, M., GREENWELL, P. und PETERS, T. D. 1997: Microsatellite instability in Yeast: Dependence on repeat unit size and DNA mismatch repair genes. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 2851 – 2858.
- BACHMANN, B., LÜKE, W. und HUNSMANN, G. 1990: Improvement of PCR amplified DNA sequencing with the aid of detergents. *Nucl. Acids Res.* **18**: 1309.

- BECKER, J. und HEUN, M. 1995: Barley microsatellites: allele variation and mapping. *Plant Mol. Biol.* **27**: 835 – 845.
- BELL, C. J. und ECKER, J. R. 1994: Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of *Arabidopsis*. *Genomics* **19**: 137 – 144.
- BELL, G. I., SELBY, M. J. und RUTTER, W. J. 1982: The high polymorphic region near the human insulin gene is composed of simple tandemly repeating sequences. *Nature* **295**: 31 – 35.
- BERNATZKY, R. und TANKSLEY, S. D. 1986: Towards a saturated linkage map in tomato based on isozymes and random cDNA sequences. *Genetica* **112**: 887 – 898.
- BIRNBOIM, H. C. und DOLY, J. 1979: A rapid alkaline extraction procedure for screening plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**: 1513 – 1523.
- BLAIR, M. W. und MCCOUCH, S. R. 1997: Microsatellite and sequence-tagged site markers diagnostic for the rice bacterial leaf blight resistance gene *xa-5*. *Theor. Appl. Genet.* **95**: 174 – 184.
- BLANQUER-MAUNONT, A. und CROUAU-ROY, B. 1995: Polymorphism, monomorphism and sequence in conserved microsatellites in primate species. *J. Mol. Evol.* **41**: 492 – 497.
- BLIGH, H. F. J., TILL, R. I. und JONES, C. A. 1995: A microsatellite sequence closely linked to the *Waxy* gene of *Oryza sativa*. *Euphytica* **86**: 83 – 85.
- BONIERBALE, M. W., PLAISTED, R. L. und TANKSLEY, S. D. 1988: RFLP maps based on a common set of clones reveal modes of chromosomal evolution in potato and tomato. *Genetics* **120**: 1095 – 1103.

- BOTSTEIN, D., WHITE, R. L., SKOLNIK, M. und DAVIS, R. W. 1980: Construction of an RFLP genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* **32**: 314 – 331.
- BRAATEN, D. C., THOMAS, J. R., LITTLE, R. D., DICKSON, K. R., GOLDBERG, I., SCHLESSINGER, D., CICCODICOLA, A. und D'URSO, M. 1988: Locations and contents of sequences that hybridize to poly (dG-dT)·(dC-dA) in mammalian ribosomal DNAs and two X-linked genes. *Nucleic Acids Res.* **16**: 865 – 881.
- BRONDANI, R. P. V., BRONDANI, C., TARCHINI, R. und GRATTAPAGLIA, D. 1998: Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. *Theor. Appl. Genet.* **97**: 816 – 827.
- BROOK, J. D., MCCURRACH, M. E., HARLEY, H. G., BUCKLER, A. J., CHURCH, D., ABURATANI, H., HUNTER, K., STANTON, V. P., THIRION, J.-P., HUDSON, T., SOHN, R., ZEMELMAN, B., SNELL, R. G., RUNDLE, S. A., CROW, S., DAVIES, J., JUVONEN, V., JOHNSON, K., HARPER, P. S., SHAW, J. und HOUSMAN, D. E. 1992: Molecular basis of myotonic dystrophy: Expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell* **68**: 799 – 808.
- BROWN, S. M., HOPKINS, M. S., MITCHELL, S. E., SENIOR, M. L., WANG, T. Y., DUNCAN, R. R., GONZALEZ-CANDELAS, F. und KRESOWICH, S. 1996: Multiple methods for the identification of polymorphic simple sequence repeats (SSRs) in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.), Moench]. *Theor. Appl. Genet.* **93**: 190 – 198.
- BUTCHER, P. A., DECROOCQ, S., GRAY, Y. und MORAN, G. F. 2000: Development, inheritance and cross-species amplification of microsatellite markers from *Acacia mangium*. *Theor. Appl. Genet.* **101**: 1282 – 1290.
- BYRNE, M., MARQUEZ-GARCIA, M. I, UREN, T, SMITH, D. S. und MORAN, G. F. 1996: Conservation of genetic diversity of microsatellite loci in the genus *Eucalyptus*. *Aust. J. Bot.* **44**: 331 – 341.

- CASKEY, C. T., PIZZUTI, A., FU, Y.-H., FENWICK JR. R. G. und NELSON, D. L. 1992: Triplet repeat mutations in human disease. *Science* **256**: 784 – 788.
- CATO, S. A. und RICHARDSON, T. E. 1996: Inter- and intraspecific polymorphism at chloroplast SSR loci and the inheritance of plastids in *Pinus radiata* D. Don.. *Theor. Appl. Genet.* **93**: 587 – 592.
- CHARTERS, Y. M., ROBERTSON, A., WILKINSON, M. J. und RAMSAY, G. 1996: PCR analysis of oilseed rape cultivars (*Brassica napus* L. ssp. *Oleifera*) using 5'-anchored simple sequence repeat (SSR) primers. *Theor. Appl. Genet.* **92**: 442 – 447.
- CHEN, X., TEMNYKH, S., XU, Y., CHO, K. G. und MCCOUCH, S. R. 1997: Development of a microsatellite framework map providing genome wide coverage in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* **95**: 553 – 567.
- COLLINS, F. und GALAS, D. 1993: A new five-year plan for the U.S. human genome project. *Science* **262**: 43 – 46.
- CONDIT, R. und HUBBELL, S. 1991: Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genomes. *Genome* **34**: 66 – 71.
- CORNEO, G., MOORE, C., SANADI, D. R., GROSSMAN, L. I. und MARMUR, J. 1966: Mitochondrial DNA in yeast and some mammalian species. *Science* **151**: 687 – 689.
- CROUAEU-ROY, B., SERVICE, S., SLATKIN, M. und FRIEMER, N. 1996: A finescale comparison of the human and chimpanzee genomes: linkage, linkage disequilibrium and sequence. *Hum. Mol. Genet.* **5**: 1131 – 1137.
- DAVIERWALA, A. P., RAMAKRISHNA, W., RANJEKAR, P. K. und GUPTA, V. S. 2000: Sequence variations at a complex microsatellite locus in rice and its conservation in cereals. *Theor. Appl. Genet.* **101**: 1291 – 1298.

- DAVIS, R. W., BOTSTEIN, D., ROTH, J. R. 1980: Advanced bacterial genetics: a manual for genetic engineering. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- DAYANANDAN, S., ROJARO, O. P., BAWA, K. S. 1998: Isolation and characterization of microsatellites in trembling aspen (*Populus tremuloides*). Theor. Appl. Genet. **96**: 950 – 956.
- DEHMER, K. J., und FRIED, W 1998: Evaluation of different microsatellites for analysing relationship in cultivated sunflower (*Helianthus annus* L.). Plant Breeding **117**: 45 – 48.
- DEKA, R., JIN, L., SHRIVER, M. D., YU, L. M., DECROO, S., HUNDRIESER, J., BUNKER, C. H., FERRELL, R. E. und CHAKRABORTY, R. 1995: Population genetics of dinucleotide (dC-dA)_n (dC-cT)_n polymorphisms in world populations. Am. J. Hum. Genet. **56**: 461 – 474.
- DELSENY, M., COOKE, R., RAYNAL, M. und GRELLET, F. 1997: The *Arabidopsis thaliana* cDNA sequencing projects. FEBS Letters **405**: 129 – 132.
- DEPEIGES, A., GOUBELY, C., LENOIR, A., COCHEREL, S., PICARD, G., RAYNAL, M., GRELLET, F. und DELSENY, M. 1995: Identification of the most represented repeated motifs in *Arabidopsis thaliana* microsatellite loci. Theor. Appl. Genet. **91**: 160 – 168.
- DEVEY, M. E., SEWELL, M. M., UREN, T. L. und NEALE, D. B. 1999: Comparative mapping in loblolly and radiata pine using RFLPs and microsatellite markers. Theor. Appl. Genet. **99**: 656 – 662.
- DIERS, B. W. und OSBORN, T. C. 1994: Genetic diversity of oilseed *Brassica napus* germ plasm based on restriction fragment length polymorphisms. Theor. Appl. Genet. **88**: 662 – 668.

- DICE, L. R. 1945: Measures of the amount of ecological association between species. *Ecology* **26**: 297 – 302.
- DOW, B. D., ASHLEY, M. V. und HOWE, H. F. 1995: Quaracterization of highly variable (GA/CT)_n microsatellites in the bur oak, *Quercus macrocarpa*. *Theor. Appl. Genet.* **91**: 137 – 141.
- ECHT, C. S. und MAY-MARQUARDT, P. 1997: Survey of microsatellite DNA in pine. *Genome* **40**: 9 – 17.
- EDELMAN, M., SCHIFF, J. A. und EPSTEIN, H. T. 1965: Studies of chloroplast development in *Euglena* XII. Two types of satellite DNA. *J. Mol. Biol.* **11**: 769 – 774.
- EDWARDS, K. J., BARKER, J. H. A., DALY, A., JONES, C. und KARP, A. 1996: Microsatellite libraries enriched for several microsatellite sequences in plants. *BioTechniques* **20**: 758 – 760.
- EFSTRATIODIS, A., POSAKONY, J. W., MANIATIS, T., LAWN, R. M., O'CONNELL, C., SPITZ, R. A., DERIEL, J. K., FORGET, B. G., WEISSMAN, S. M., SLIGHTOM, J. L., BLECHL, A. E., SMITHIES, O., BARALLE, F. E., SHOULDERS, C. und PROUDFOOT, N. J. 1980: The structure and evolution of the human β -globin gene family. *Cell* **21**: 653 – 668.
- EMERSON, R. A., BEADLE, G. W. und FRASER, A. C. 1935: A summary of linkage studies in maize. *Cornell Univ. Agr. Exp. Sta. Memoir.* 180.
- EPPLEN, J. T., KYAS, A. und MÄUELER, W. 1996: Genomic sample repetitive DNAs are targets of difficult binding of nuclear proteins. *FEBS letters* **389**: 92 – 95.
- FISCHER, P. J., GARDNER, R. C. und RICHARDSON, T. E. 1996: Single locus microsatellites isolated using 5'anchored PCR. *Nucl. Acids Res.* **24**: 4369 – 4371.

- FEINBERG, A. P. und VOGELSTEIN, B. 1983: A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**: 266 – 267.
- FÖRSTER, J. und KNAAK, C. 1995: Estimation of the genetic distance of 21 winter rapeseed varieties by RAPD analyses in comparison to RFLP results. *Genomic Variation Exploitation* **42**: 1184 – 1186.
- FÖRSTER, J., KNAAK, C. und WEYEN, J. 1999: Microsatellites for analysing rapeseed genotypes. 10th International Rapeseed Congress, Canberra, Australia.
- FU, Y.-H., PIZZUTI, A., FENWICK JR., G., KING, J., RAJNARAYAN, S., DUNNE, P. W., DUBEL, J., NASSER, G. A., ASHIZAWA, T., DE JONG, P., WIERINGA, B., KORNELUK, R., PERRYMAN, M. B., EPSTEIN, H. F. und CASKEY, C. T. 1992: An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy. *Science* **255**: 1256 – 1258.
- GARZA, J. C., SLATKIN, M. und FREIMER, N. B. 1995: Microsatellite allele frequencies in human and chimpanzees with implications for constraints on allele size. *Mol. Biol. Evol.* **12**: 594 – 603.
- GRIST, S. A., FIRGAIRA, F. A. und MORLEY, A. A. 1993: Dinucleotide repeat polymorphisms isolated by the polymerase chain reaction. *BioTechniques* **15**: 304 – 308.
- GROBEN, R. 1998: Mikrosatelliten bei der Zuckerrübe (*Beta vulgaris* L.) und ihre Verwendung als molekulare Marker. Dissertation, Institut für Angewandte Genetik, FB Biologie, Universität Hannover.
- GROBEN, R. und WRICKE, G. 1998: Occurrence of microsatellites in spinach sequences from computer databases and development of polymorphic SSR markers. *Plant Breeding* **117**: 271 – 274.

- GROSS, D. S. und GARRARD, W. T. 1986: The ubiquitous potential Z-forming sequence of eucaryotes, (dT-dG)_n (dC-dA)_n is not detectable in the genomes of *eubacteria*, *archaeobacteria*, or mitochondria. *Mol. Cell. Biol.* **6**: 3010 – 3013.
- HAMADA, H. und KAKUNAGA, T. 1982: Potential Z-DNA forming sequences are highly dispersed in the human genome. *Nature* **298**: 396 – 398.
- HAMADA, H., PETRINO, M. G. und KAKUNAGA, T. 1982a: Molecular structure and evolutionary origin of human cardiac muscle actin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 5901 – 5905.
- HAMADA, H., PETRINO, M. G. und KAKUNAGA, T. 1982b: A novel repeated element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 6465 – 6469.
- HAMADA, H., PETRINO, M. G., KAKUNAGA, T., SEIDMAN, M. und STOLLAR, D. 1984: Characterization of genomic poly(dT-dG)·poly(dC-dA) sequences: structure, organization and conformation. *Mol. Cell. Biol.* **4**: 2610 – 2621.
- HARRISON, G. E. und HESLOP-HARRISON, J. S. 1995: Centromeric repetitive DNA sequences in the genus *Brassica*. *Theor. Appl. Genet.* **90**: 157 – 165.
- HUANG, N., ANGELES, E. R., DOMINGO, J., MAGPANTAY, G., SINGH, S., ZHANG, G., KUMARAVADIVEL, N., BENNETT, J. und KHUSH, G. S. 1997: Pyramiding of bacterial blight resistance genes in rice: Marker-assisted selection using RFLP and PCR. *Theor. Appl. Genet.* **95**: 313 – 320.
- HUGHES, A. E. 1993: Optimization of microsatellite analysis for genetic mapping. *Genomics* **15**: 433 – 434.
- JACOB, H. J., LINDPAINTNER, K., LINCOLN, S. E., KUSUMI, K., BUNKER, R. K., MAO, Y.-P., GANTEN, D., DZAU, J. und LANDER, E. 1991: Genetic mapping of a gene causing hypertension in the stroke-prone spontaneously hypersensitive rat. *Cell* **67**: 213 – 224.

- JEFFREYS, A. J., WILSON, V. und THEIN, S. L. 1985: Hypervariable ‚minisatellite‘ regions in human DNA. *Nature* **314**: 67 – 73.
- KIJAS, J. M. H., FOWLER, J. C. S. und THOMAS, M. R. 1995: An evaluation of sequence tagged microsatellite site markers for genetic analysis within *Citrus* and related species. *Genome* **38**: 349 – 355.
- KIT, S. 1962: Species differences in animal deoxyribonucleic acids as revealed by equilibrium sedimentation in density gradients. *Nature* **193**: 274 – 275.
- KNAACK, C. 1996: Schätzung genetischer Distanzen mittels RFLPs zur Identifizierung von Genpools für die Hybridzüchtung bei Winterraps. Dissertation, Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, FB Agrarwissenschaft, Universität Göttingen.
- KONFORTOV, B. A., LICENCE, V. E. und MILLER, J. R. 1999: Re-sequencing of DNA from a diverse panel of cattle reveals a high level of polymorphism in both intron and exon. *Mammalian Genome* **10**: 1142 – 1145.
- KOSAMBI, D. D. 1944: The estimation of map distances from recombination values. *Ann. Eugen.* **12**: 172 – 175.
- KOSTIA, S., VARIO, S.-L., VAKKARI, P. und PULKKINEN 1995: Microsatellite sequences in a conifer, *Pinus sylvestris*. *Genome* **38**: 1244 – 1248.
- KRESOVICH, S., SZEWC-MCFADDEN, A. K., BLIEK, S. M. und MCFERSON, J. R. 1995: Abundance and characterization of simple sequence repeats (SSRs) isolated from a size-fractionated genomic library of *Brassica napus* L. (rapeseed). *Theor. Appl. Genet.* **91**: 206 – 211.
- LAGERCRANTZ, U. und LYDIATE, D. J. 1996: Comparative genome mapping in *Brassica*. *Genetics* **144**: 1903 – 1910.

- LAGERCRANTZ, U., ELLEGREN, H. und ANDERSSON, L. 1993: The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. *Nucl. Acids. Res.* **21**: 1111 – 1115.
- LANDER, E. S., GREEN, P., ABRAHAMSON, J., BARLOW, A., DALY, M. J., LINCOLN, S. E. und NEWBURG, L. 1987: MAPMAKER: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* **1**: 174 – 181.
- LANDRY, B. S., HUBERT, N., ETOH, T., HARADA, J. J. und LINCOLN, S. E. 1987: A genetic linkage map of lettuce (*Lactuca sativa* L.) with restriction fragment length polymorphism, isozyme, disease resistance and morphological markers. *Genetics* **116**: 331 – 337.
- LAVI, U., AKKAYA, M., BHAGWAT, A., LAHAV, E. und CREGAN, P. B. 1994: Methodology of generation and characterization of simple sequence repeat DNA markers in avocado (*Persea americana* M.). *Euphytica* **80**: 171 – 177.
- LESPINASSE, D., RODIER-GOUD, M., GRIVET, L., LECONTE, A., LEGNATE, H. und SEGUIN, M. 2000: A saturated genetic map of rubber tree (*Hevea* spp.) based on RFLP, AFLP, microsatellite, and isozyme markers. *Theor. Appl. Genet.* **100**: 127 – 138.
- LEVINSON, G. und GUTMAN, G. A. 1987: High frequencies in poly-CA/TG tandem repeats by bacteriophage M13 in *Esherichia coli* K-12. *Nucl. Acids Res.* **15**: 5323 – 5338.
- LINK, W., DIXKENS, C., SINGH, M., SCHWALL, M. und MELCHINGER, A. E. 1995: Genetic diversity in european and mediteranean faba bean germ plasm revealed by RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* **90**: 27 – 32.
- LITT, M. und LUTY, J. A. 1989: A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.* **44**: 397 – 401.

- LIU, Z., SUN, Q., NI, Z. und YANG, T. 1999: Development of SCAR markers linked to the *Pm21* gene conferring resistance to powdery mildew in common wheat. *Plant Breeding* **118**: 215 – 219.
- LORIDON, K., COURNOYER, B., GOUBELY, C., DEPEIGES, A. und PICARD, G. 1998: Length polymorphism and allele structure of trinucleotide microsatellites in natural assecions of *Arabidopsis thaliana*. *Theor. Appl. Genet.* **97**: 591 – 604.
- LUTY, J. A., GUO, Z., WILLARD, H. F., LEDBETTER, D. H., LEDBETTER, S. und LITT, M. 1990: Five polymorphic microsatellite VNTRs on the human X chromosome. *Am. J. Hum. Genet.* **46**: 776 – 783.
- MA, Z. Q., RÖDER, M. und SORRELLS, M. E. 1996: Frequencies and sequence characteristics of di-, tri- and tetra-nucleotide microsatellites in wheat. *Genome* **39**: 123 – 130.
- MACARTHUR, J. W. 1934: Linkage groups in tomato. *J. Genet.* **29**: 123 – 133.
- MARTIN, J. P., und SANCHEZ-YELAMO, M. D. 2000: Genetic relationships among species of the genus *Diplotaxis* (*Brassicaceae*) using inter-simple sequence repeat markers. *Theor. Appl. Genet.* **101**: 1234 – 1241.
- MAUGHAN, P. J., SAGHAI MAROOF, M. A. und BUSS, G. R. 1995: Microsatellite and amplified sequence length polymorphisms in cultivated and wild soybean. *Genome* **38**: 715 – 723.
- MCCOUCH, S. R., CHEN, X., PANAUD, O., TEMNYKH, S., XU CHO, Y., GU, Y., HUANG, N., ISHII, T. und BLAIR, M. 1997: Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding. *Plant Mol. Biol.* **35**: 89 – 99.
- MEKSEM, K., RUBEN, E., HYTEN, D., TRIWITAYAKORN, K. und LIGHTFOOT, D. A. 2001: Conservation of AFLP bands into high-throughput DNA markers. *Mol. Genet. Genom.* **132**: 85 – 97.

- MENGONI, A., RUGGINI, C., VENDRAMIN, G. G. und BAZZICALUPO, M. 2000: Chloroplast microsatellite variations in tetraploid alfalfa. *Plant Breeding* **119**: 509 – 512.
- MESELSON, M., STAHL, F. W. und VINOGRAD, J. 1957: Equilibrium sedimentation of macromolecules in density gradients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **43**: 582 – 588.
- MIESFELD, R., KRYSTAL, M. und ARNHEIM, N. 1981: A number of a new repeated sequence family which is conserved through eucaryotic evolution is found between the human δ - and β - globin genes. *Nuc. Acids Res.* **9**: 5931 – 5947.
- MODRICH, P. und LAHUE, R. 1996: Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Ann. Rev. Biochem.* **65**: 101 – 133.
- MÖRCHEN, M., CUGUEN, J., MICHAELIS, G., HÄNNI, C. und SAUMITOU-LAPRADE, P. 1996: Abundance and length polymorphism of microsatellite repeats in *Beta vulgaris* L.. *Theor. Appl. Genet.* **92**: 326 – 333.
- MORGANTE, M. und OLIVIERI, A. M. 1993: PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant J.* **3**: 175 – 182.
- MORGANTE, M., RAFALSKI, A., BIDDLE, P., TINGEY, S. und OLIVIERI, A. M. 1994: Genetic mapping and variability of seven soybean simple sequence repeat loci. *Genome* **37**: 763 – 769.
- MORTON, N. 1955: Sequential tests for the detection of linkage. *Amer. J. Hum. Genet.* **7**: 277 – 318.
- MOXON, E. R. und WILLS, C. 1999: Stottergene im Erbgut. Scheinbar nutzlose DNA beschleunigt die Evolution. *Spektrum der Wissenschaft* **8**: 62 – 69.
- MOXON, E. R., RAINEY, P. B., NOWAK, M. A. und LENSKI, R. E. 1994: Adaptive evolution of highly mutable loci in pathogenic bacteria. *Current Biol.* **4**: 24 – 33.

- MULLIS, K. B. und FALOONA, F. A. 1987: Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalysed chain reaction. *Meth. Enzym.* **155**: 335 – 351.
- MURRAY, V. 1989: Improved double-stranded DNA sequencing using the linear polymerase chain reaction. *Nucl. Acids. Res.* **17**: 8889.
- NAKAMURA, Y., LEPPERT, M., O'CONNELL, P., WOLFF, R., HOLM, T., CULVER, M., MARTN, C., FUJIMOTO, E., HOFF, M., KUMLIN, E. und WHITE, R. 1988: Variable number of tandem repeats (VNTR) markers for the human gene mapping. *Science* **235**: 1616 – 1622.
- NEI, M. und LI, 1979: Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **76**: 5256 – 5273.
- OLSON, M., HOOD, L., CANTOR, C. und BOTSTEIN, D. 1989: A common language for physical mapping of the human genome. *Science* **245**: 1434 – 1435.
- PARAN, I. und MICHELMORE, R. W. 1993: Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor. Appl. Genet.* **85**: 985 – 993.
- PARDUE, M. L., LÖWENHAUPT, K., RICH, A. und NORDHEIM, A. 1987: (dC-dT)_n (dG-dT)_n sequences have evolutionarily conserved chromosomal locations in *Drosophila* with implications for roles in chromosome structure and function. *EMBO J.* **6**: 1781 – 1789.
- PLASCHKE, J., GANAL, M. W. und RÖDER, M. S. 1995: Detection of genetic diversity in closely related wheat using microsatellite markers. *Theor. Appl. Genet.* **91**: 1001 – 1006.
- POWELL, W., MACHRAY, G. C. und PROVAN, J. 1996: Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends Plant Sci.* **7**: 215 – 222.

- PREVOST, A. und WILKINSON, M. J. 1999: A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theor. Appl. Genet.* **98**: 107 – 112.
- PROVAN, J., POWELL, W. und WAUGH, R. 1996: Microsatellite analysis of relationships within cultivated potato (*Solanum tuberosum*). *Theor. Appl. Genet.* **92**: 1078 – 1084.
- RABINOWITZ, M., SINCLAIR, J., DESALLE, L., HASELKORN, R. und SWIFT, H. H. 1965: Isolation of deoxyribonucleic acid from mitochondria of chick embryo heart and liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **53**: 1126 – 1133.
- RAY, D. S. und HANAWALD, P. C. 1965: Satellite DNA components in *Euglena gracilis* cells lacking chloroplasts. *J. Mol. Biol.* **11**: 760 – 768.
- RIBAUT, J.-M. und HOISINGTON, D. 1998: Marker-assisted selection: new tools and strategies. *Trends Plant Sci.*, **3**: 236 – 239.
- RIBAUT, J.-M., HU, X., HOISINGTON, D. und GONZALEZ-DE-LEON, D. 1997: Use of STSs and SSRs as rapid and reliable preselection tools in a marker-assisted selection-backcross scheme. *Plant Mol. Biol. Rep.* **15**: 154 – 162.
- RÖDER, M. S., PLASCHKE, J., KÖNIG, S. U., BÖRNER, A., SORRELL, A., TANKSLEY, S. D. und GANAL, M. W. 1995: Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. *Mol. Gen. Genet.* **246**: 327 – 333.
- ROGERS, S. O. und BENDICH, A. J. 1988: Extraction of DNA from plant tissues. *Plant Mol. Biol. Manual* **A6**: 1 – 10.
- RONGWEN, J., AKKAYA, M. S., BHAGWAT, A. A., LAVI, U. und CREGAN, P. B. 1995: The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification. *Theor. Appl. Genet.* **90**: 43 – 48.

- ROSSETTO, M., MCLAUCHLAN, A., AHARRISS, F. D., HENRY, R. J., BAVERSTOCK, P. R., LEE, L. S., MAGUIRE, T. L. und EDWARDS, K. J. 1999: Abundance and polymorphism of microsatellite markers in the tea tree (*Melaleuca alternifolia*). *Theor. Appl. Genet.* **98**: 1091 – 1098.
- ROYLE, N. J., CLARKSON, R., WONG, Z. und JEFFREYS, A. J. 1987: Preferential localization of hypervariable minisatellites near human telomeres. *Human Gene Mapping 9*, 1987. *Cytogenet. Cell Genet.* **46**: 685.
- SAIKI, R. K., GELFAND, D. H, STOFFEL, S., SCHARF, S., HIGUCHI, R., HORN, G. T., MULLIS, K. B. und ERLICH, H. A. 1988: Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487 – 491.
- SAIKI, R. K., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K. B., HORN, G. T., ERLICH, H. A. und ARNHEIM, N. 1985: Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350 – 1354.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. E. und MANIATIS, T. 1989: *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- SANGER, F., NICKLEN, S. und COULSON, A. R. 1977: DNA-sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5363 – 5467.
- SÁNCHEZ DE LA HOZ, M. P., DÁVILA, J. A., LOARCE, Y. und FERRER, E. 1996: Simple sequence repeat primers used in polymerase chain reaction amplifications to study genetic diversity in barley. *Genome* **39**: 112 – 117.
- SASAKI, T., YANO, M., KURATA, N. und YAMAMOTO, K. 1996: The japanese Rice Genome Research Program. *Genome Research* **6**: 661 – 666.

- SENIOR, M. L. und HEUN, M. 1993: Mapping maize microsatellite and polymerase chain reaction confirmation of the targeted repeats using a CT primer. *Genome* **36**: 884 – 889.
- SHARIFLOU, M. R., und SHARP, P. J. 1999: A polymorphic microsatellite in the 3' end of 'waxy' genes of wheat, *Triticum aestivum*. *Plant Breed.* **118**: 275 – 277.
- SHARMA, P. C., HÜTTEL, B., WINTER, P., KAHL, G., GARDNER, R. C. und WEISING, K. 1995: The potential of microsatellites for hybridization- and polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and related species. *Electrophoresis* **16**: 1755 – 1761.
- SIMMLER, M. C, JOHNSON, C., PETIT, C., ROUYER, F., VERGNAUD, G. und WEISSENBACH, J. 1987: Two highly polymorphic microsatellites from the pseudoautosomal region of the human sex chromosomes. *EMBO J.* **6**: 963 – 969.
- SLOCUM, M. K., FIGDORE, S. S., KENNARD, W. C., SUZUKI, J. Y. und OSBORNE, T. C. 1990: The linkage arrangement of restriction fragment length polymorphism loci in *Brassica oleracea*. *Theor. Appl. Genet.* **80**: 57 – 64.
- SMEETS, H. J. M., BRUNNER, H. G., ROPERS, H. H. und WIERINGA, B. 1989: Use of variable simple sequence motifs as genetic markers: Application to study of myotonic dystrophy. *Hum. Gen.* **83**: 245 – 251.
- SMITH, G. P. 1976: Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossover. *Science* **191**: 528 – 535.
- SOMERS, D. J., ZHOU, Z., BEBELI, P. J. und GUSTAFSON, J. P. 1996: Repetitive, genome-specific probes in wheat (*Triticum aestivum* L. em Thell) amplified with minisatellite core sequences. *Theor. Appl. Genet.* **93**: 982 – 989.
- SONG, K. M., OSBORNE, T. C. und WILLIAMS, P. H. 1988: *Brassica* taxonomy based on nuclear restriction fragment length polymorphisms (RFLPs). 1. Genome evolution of diploid and amphidiploid species. *Theor. Appl. Genet.* **75**: 784 – 794.

- SONG, K., OSBORNE, T. C. und WILLIAMS, P. H. 1990: *Brassica* taxonomy based on nuclear restriction fragment length polymorphisms (RFLPs). 3. Genome relationships in *Brassica* and related genera and the origin of *B. oleracea* and *B. rapa* (syn. *campestris*). *Theor. Appl. Genet.* **79**: 497 – 506.
- SONG, K., LU, P., TANG, K., OSBORN, T. C. 1995: Rapid genome change in synthetic polyploids of *Brassica* and its implication for polyploid evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 7719 – 7723.
- SOUTHERN, E. M. 1975: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503 – 517.
- SPRECHER, C. J., PUERS, C., LINS, A. M. und SCHRUMM, J. W. 1996: General approach to analysis of polymorphic short tandem repeat loci. *BioTechniques* **20**: 266 – 276.
- STALLINGS, R. L., FORD, A. F., NELSON, D., TORNEY, D. C., HLDEBRAND, C. E. und MOYZIS, R. K. 1991: Evolution and distribution of (GT)_n repetitive sequences in mammalian genomes. *Genome* **10**: 807 – 815.
- STEINKELLNER, H., FLUCH, S., TURETSCHKE, E., LEXER, C., STREIFF, R., KREMER, A., BURG, K., und GLOSSL, J. 1997: Identification and characterization of (GA/CT)_n-microsatellite loci from *Quercus petraea*. *Plant Mol. Biol.* **33**: 1093 – 1096.
- SUN, G.-L., SALOMON, B. und BOTHMER, R. V. 1998: Characterization and analysis of microsatellite loci in *Elymus caninus* (*Triciceae: Poaceae*). *Theor. Appl. Genet.* **96**: 676 – 682.
- TABOR, S. und RICHARDSON, 1997: The thioredoxin binding domain of bacteriophage T7 DNA polymerase confers processivity on *Escherichia coli* DNA polymerase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 479 – 484.

- TANKSLEY, S. D. 1983: Molecular markers in plant breeding. *Plant Mol. Biol. Rep.* **1**: 3 – 8.
- TANKSLEY, S. D. und MCCOUCH, S. R. 1997: Seed banks and molecular maps: unlocking genetic potential from the wild. *Science* **277**: 1063 – 1066.
- TANKSLEY, S. D. und RICK, C. M. 1980: Isomeric gene linkage map of the tomato: Applications in genetics and breeding. *Theor. Appl. Genet.* **57**: 161 – 170.
- TARAMINO, G. und TINGEY, S. 1996: Simple sequence repeats for germplasm analysis and mapping in maize. *Genome* **39**: 277 – 287.
- TAUTZ, D. 1989: Hypervariability of simple sequences as a general source of polymorphic DNA markers. *Nuc. Acids Res.* **17**: 6463 – 6471.
- TAUTZ, D. und RENZ, M. 1984: Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nuc. Acids Res.* **12**: 4127 – 4138.
- TEULAT, B., ALDAM, C., TREHIN, R., LEBRUN, P., BARKER, J. H., ARNOLD, G. M., KARP, A., BAUDOUIN, L. und ROGNON, F. 2000: An analysis of genetic diversity in coconut (*Cocos nucifera*) populations from across the geographic range using sequence-tagged microsatellites (SSRs) and AFLPs. *Theor. Appl. Genet.* **100**: 764 – 771.
- TERAUCHI, R. und KONUMA, A. 1994: Microsatellite polymorphism in *Dioscorea tokoro*, a wild yam species. *Genome* **37**: 794 – 801.
- THOMAS, M. R. und SCOTT, N. S. 1993: Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence-tagged sites (STSs). *Theor. Appl. Genet.* **86**: 985 – 990.
- U, N. 1935: Genome Analysis in *Brassica* with special reference of the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization. *Jpn. J. Bot.* **7**: 389 – 452.

- UZUNOVA, M. 1994: Erstellung einer RFLP-Karte von Raps (*Brassica napus* L.) und Kartierung erster züchterisch wichtiger Gene. Dissertation, Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, FB Agrarwissenschaft, Universität Göttingen.
- UZUNOVA, M. I. und ECKE, W. 1999: Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Plant Breeding* **118**: 323 – 326.
- UZUNOVA, M., ECKE, W., WEISSLEDER, K. und RÖBBELEN, G. 1995: Mapping the genome of rapeseed (*Brassica napus* L.). I. Construction of an RFLP linkage map and localization of QTLs for seed glucosinolate content. *Theor. Appl. Genet.* **90**: 194 – 204.
- VARGHESE, J. P., RUDOLPH, B., UZUNOVA, M., ECKE, W. 2000: Use of 5'-anchored primers for the enhanced recovery of specific microsatellite markers in *Brassica napus* L.. *Theor. Appl. Genet.* **101**: 115 – 119.
- VALLE, G. 1993: TA-repeat microsatellites are closely associated with ARS consensus sequences in yeast chromosome III. *Yeast* **9**: 753 – 759.
- VAN DE VEN, W. T. G. und MCNICOL, R. J. 1996: Microsatellites as DNA markers in *Sitka spruce*. *Theor. Appl. Genet.* **93**: 613 – 617.
- VAN DEYNZE, A. E., NELSON, J. C., O'DONOUGHUE, L. S., AHN, S. N., SIRIPOONWIWAT, W., HARRINGTON, S. E., YGLESIAS, E. S., BRAGA, D. P., MCCOUCH, S. R. und SORRELLS, M. E. 1995: Comparative mapping in grasses. Oat relationships. *Mol. Gen. Genet.* **249**: 349 – 356.
- VOS, P., HOGERS, R., BLEEKER, M., REIJANS, M., VAN DE LEE, T., HORNES, M., POT, J., PELEMAN, J., KUIPER, M. und ZABEAU, M. 1995: AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res.* **23**: 4407 – 4414.
- WANG, Z., WEBER, J. L., ZHONG, G. und TANKSLEY, S. D. 1994: Survey of plant short tandem repeats. *Theor. Appl. Genet.* **88**: 1 – 6.

- WEBER, J. L. 1990: Informativeness of human (dC-dA)_n · (dG-dT)_n polymorphisms. *Genomics* **7**: 524 – 530.
- WEBER, J. L. und MAY, P. E. 1989: Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am. J. Hum. Genet.* **44**: 88 – 396.
- WEISING, K. und GARDNER, R. C. 1999: A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genome of dicotyledonous angiospermes. *Genome* **42**: 9 – 19.
- WELSH, J., PETERSON, C. und MCCLELLAND, M. 1991: Polymorphisms generated by arbitrarily primed PCR in the mouse: application to strain identification and genetic mapping. *Nucl. Acids Res.* **19**: 303 – 306.
- WESTMAN, A. L. und KRESOVICH, S. 1997: Use of molecular marker techniques for description of plant genetic variation. *Aus: Biotechnology and plant genetic resources. Conservation and use.* Callow, Ford-Lloyd und Newbury, CAB International.
- WHITKUS, R., DOEBLEY, J. und LEE, M. 1992: Comparative Genome Mapping of *Sorghum* and Maize. *Genetics* **132**: 1119 – 1130.
- WHITTON, J., RIESEBERG, L. H. und UNGERER, M. C. 1997: Microsatellite loci are not conserved across the *Asteraceae*. *Mol. Biol. Evol.* **14**: 204 – 209.
- WILLIAMS, J. G. K., KUBELIK, A. R., KENNETH, J. L., RAFALSKI, J. A. und TINGEY, S. V. 1990: DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are usefull as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* **18**: 6531 – 6535.
- WINSHIP, P. R. 1989: An improved method for directly sequencing PCR amplified material using dimethyl sulphoxide. *Nucl. Acids Res.* **17**: 1266

- WOOD, W. B. 1966: Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*: bacterial mutations affecting the restriction and modification of DNA. *J. Mol. Biol.* **16**: 118 – 133.
- WU, K.-S. und TANKSLEY, S. D. 1993: Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. *Mol. Gen Genet.* **41**: 225 – 235.
- YANG, G. P., SAGHAI MAROF, M. A., XU, C. G., ZHANG, Q. und BIYASHEV, R. M. 1994: Comparative analysis of microsatellite DNA polymorphism in landraces and cultivars of rice. *Mol. Gen. Genet.* **245**: 187 – 194.
- YOUNG, N. D. und TRANKSLEY, S. D. 1989: Restriction fragment length polymorphism maps and the concept of graphical genotypes. *Theor. Appl. Genet.* **77**: 95 – 101.
- ZABEAU, M. und VOS, P. 1993: Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. European Patent Application: No. 92402629.7, publication No.: EP 0534858-A1.
- ZHAO, K. und KOCHERT, G. 1993: Phylogenetic distribution and genetic mapping of a (GGC)_n microsatellite from rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Mol. Biol.* **21**: 607 – 614.
- ZIETKIEWITZ, E., RAFALSKI, A. und LABUDA, D. 1994: Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomes* **20**: 176 – 183.

7 Anhang

7.1 Anhang A: Verwendete Chemikalien und Enzyme

Substanz	Hersteller
Acryl-Bisacrylamid	Appligene Oncor, Gaithersburg, USA
Agarose	PeqLab, Erlangen
Blocking Reagens	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
BSA	Biomol, Hamburg
[α - ³² P]dCTP	ICN Pharmaceuticals, California, USA
Cy5 AutoRead Sequencing Kit	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
10 bp DNA Ladder	Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe
100 bp DNA Ladder	Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe
Dextranblau	Roth
dNTP-Set	PeqLab, Erlangen
EDTA	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Euro-Alkohol, Nordhausen
Kanamycin	Duchefa, Leiden, Niederlande
Lambda DNA/ <i>Eco</i> 130I(<i>Sty</i> I) Marker	MBI Fermentas, St.-Leon-Rot
λ DNA, <i>Hind</i> III und <i>Eco</i> RI geschnitten	New England Biolabs, Beverly, USA
MetaPhor Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf
Poly(dA-dG)-Poly(dC-dT)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Poly (dA-dC)-Poly(dG-dT)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Prime-It II random primer labeling kit	Stratagene Europe, Heidelberg
Proteinase K	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN, Hilden
ReproGel High Resolution	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
ReproGel Long Read	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas, St.-Leon-Rot
SDS	BioRad, Hercules, USA
T ₄ -Ligase	Stratagene Europe, Heidelberg
Taq-DNA-Polymerase	Peqlab, Erlangen
Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Tris-HCL	ICN Biochemicals, Eschwege
x-Gal	Stratagene Europe, Heidelberg
ZAP Express Predigested Gigapack Cloning Kit	Stratagene Europe, Heidelberg
ZAP Express Predigested Vector Kit	Stratagene Europe, Heidelberg

7.2 Anhang B: Liste der untersuchten *Brassica*-Genotypen

Nr.	Genotyp	Art	Züchter	Genom	Typ
1	Apache	<i>Brassica napus</i>	Cambridge Plant Breeders	AACC	Winterraps
2	Bristol	<i>Brassica napus</i>	Deutsche Saatveredelung	AACC	Winterraps
3	Italy	<i>Brassica napus</i>	Huazhong Agricultural University, China	AACC	Winterraps
4	Lincoln	<i>Brassica napus</i>	Deutsche Saatveredelung	AACC	Winterraps
5	Mansholt's Hamburger Raps	<i>Brassica napus</i>	Dr. R.J. Mansholt's Veredelingsbedrijf B.V., Niederlande	AACC	Winterraps
6	Sollux	<i>Brassica napus</i>	Sachsensaaten Dresden, Helmfried Dienel	AACC	Winterraps
7	Vivol	<i>Brassica napus</i>	Deutsche Saatveredelung	AACC	Winterraps
8	Wotan	<i>Brassica napus</i>	Norddeutsche Pflanzenzucht	AACC	Winterraps
9	Falcon	<i>Brassica napus</i>	Norddeutsche Pflanzenzucht	AACC	Winterraps
10	Samourai	<i>Brassica napus</i>	Serasem, Frankreich	AACC	Winterraps
11	Accord	<i>Brassica napus</i>	Norddeutsche Pflanzenzucht	AACC	Winterraps
12	Express	<i>Brassica napus</i>	Norddeutsche Pflanzenzucht	AACC	Winterraps
13	Jet Neuf	<i>Brassica napus</i>	Serasem, Frankreich	AACC	Winterraps
14	Lenora	<i>Brassica napus</i>	Saatzucht Lembke Malchow	AACC	Winterraps
15	Score	<i>Brassica napus</i>	Cambridge Plant Breeders, Großbritannien	AACC	Winterraps
16	Liberator	<i>Brassica napus</i>	Deutsche Saatveredelung	AACC	Winterraps
17	Capitol	<i>Brassica napus</i>	Deutsche Saatveredelung	AACC	Winterraps
18	Lirajet	<i>Brassica napus</i>	Deutsche Saatveredelung	AACC	Winterraps
19	Mohican	<i>Brassica napus</i>	Saatzucht P.H. Petersen	AACC	Winterraps
20	Crusher	<i>Brassica napus</i>	Svalöf, Schweden	AACC	Sommerraps
21	Drakkar	<i>Brassica napus</i>	Serasem, Frankreich	AACC	Sommerraps
22	Duplo	<i>Brassica napus</i>	W. v. Borries, Eckendorf GmbH & Co	AACC	Sommerraps
23	Petranova	<i>Brassica napus</i>	Lochow-Petkus GmbH	AACC	Sommerraps
24	Tanto	<i>Brassica napus</i>	Serasem, Frankreich	AACC	Sommerraps
25	Taparoo	<i>Brassica napus</i>	Victorian Department of Agriculture, Australien	AACC	Sommerraps
26	Star	<i>Brassica napus</i>	DLF-Trifolium A/S	AACC	Sommerraps
27	Global	<i>Brassica napus</i>	Svalöf, Schweden	AACC	Sommerraps
28	Excel	<i>Brassica napus</i>	Agriculture Canada, Kanada	AACC	Sommerraps
29	Lambada	<i>Brassica napus</i>	W. von Borries-Eckendorf GmbH & Co.	AACC	Sommerraps
30	Starlight	<i>Brassica napus</i>	Svalöf, Schweden	AACC	Sommerraps
31	Sputnik	<i>Brassica napus</i>	Klein Wanslebener Saatzucht	AACC	Sommerraps
32	Topas	<i>Brassica napus</i>	Svalöf, Schweden	AACC	Sommerraps
33	Andor	<i>Brassica napus</i>	University of Alberta, Kanada	AACC	Sommerraps
34	Sponsor	<i>Brassica napus</i>	Norddeutsche Pflanzenzucht	AACC	Sommerraps
35	Emerald	<i>Brassica napus</i>	Department of Agriculture and Fisheries, Irland	AACC	Sommerraps
36	Jumbo	<i>Brassica napus</i>	W. von Borries-Eckendorf GmbH & Co.	AACC	Sommerraps
37	Westar	<i>Brassica napus</i>	Research Institut for Crop Production, CSSR	AACC	Sommerraps
38	Apollo	<i>Brassica napus</i>	University of Manitoba, Kanada	AACC	Sommerraps
39	Yuki	<i>Brassica rapa</i>	Sakata	AA	Chinakohl
40	Savanna	<i>Brassica rapa</i>	Sakata	AA	Spinatsenf
41	Lembkes Malchower BRA184	<i>Brassica rapa</i>	Norddeutsche Pflanzenzucht	AA	Rübsen

Anhang B: Liste der untersuchten *Brassica*-Genotypen (Fortsetzung)

Nr.	Genotyp	Art	Züchter	Genom	Typ
42	Aspiration	<i>Brassica oleracea</i>	Sakata	CC	Brokkoli
43	Blue Vantage	<i>Brassica oleracea</i>	Sakata	CC	Kohl
44	White Passion	<i>Brassica oleracea</i>	Sakata	CC	Blumenkohl
45	34223BAZ	<i>Brassica nigra</i>	Göttinger Sortiment	BB	Schwarzer Senf
46	486a	<i>Brassica carinata</i>	Göttinger Sortiment	AABB	Rutenkohl
47	3223	<i>Brassica juncea</i>	Göttinger Sortiment	BBCC	Abessinischer Senf
48	DH 5.1 Mansholt	<i>Brassica napus</i>	Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, Universität Göttingen	AACC	Winterraps
49	DH 5.2 Mansholt	<i>Brassica napus</i>	Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, Universität Göttingen	AACC	Winterraps
450	DH 11.4 Samourai	<i>Brassica napus</i>	Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung Universität Göttingen	AACC	Winterraps
51	R54	<i>Brassica napus</i>	Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung Universität Göttingen	AACC	Resyntheseraps

7.3 Anhang C: Übersicht über alle identifizierten SSR-Klone

Nr.	Klon	SSR	SSR-Länge [bp]	SSR-Art	SSR-Primer
1	MR1	(TC) ₃ (TTC) ₂ (CT) ₂ CN(TC) ₃ (TTC) ₂ TCT	33	imperfekt	1
2	MR3	(GAG) ₃ G(GA) ₅ G(GA) ₅ AG(GA) ₆ CACGGCGCAG ₄ (AG) ₆ GCTT(GA) ₅ *	105	imperfekt	2
3	MR5	(AAG) ₂ G(GA) ₂ A ₄ (GA) ₄ (GA) ₂ AG	132	imperfekt	3
4	MR8	(GA) ₆ TAGATA(GA) ₄₆ TA(GA) ₇ (CA) ₁₀ (TA) ₇	20 14 24	perfekt perfekt perfekt	4 5 6
5	MR12	(GT) ₁₂	24	perfekt	6
6	MR13	(GA) ₁₂ + (AG) ₇ A(AG) ₂	24 + 19	perfekt + imperfekt	7 (enthält 2 SSRs)
7	MR14	(AG) ₁₅	30	perfekt	8
8	MR16	(CA) ₁₅	30	perfekt	9
9	MR17	(CT) ₁₂	24	perfekt	10
10	MR18	(AG) ₁₆ (CGAG) ₂	46	imperfekt	11
11	MR21	C(CT) ₆ GT(CT) ₂ TAT(CT) ₅ (TC) ₂ (CT) ₂	46	imperfekt	12
12	MR22	(CT) ₆ GT(CT) ₂ AT(CT) ₅ TCTCCTCT	44	imperfekt	13
13	MR25	(AG) ₁₄	28	perfekt	14
14	MR26	poly GA, Sekundärstruktur	ca. 60	n. b.	15
15	MR27	poly CT, Sekundärstrukturen	ca. 55	n. b.	---
16	MR28	kein SSR	---	---	---
17	MR29	(GA) ₃₉	78	perfekt	16 (Ankerprimer)
18	MR30	(GA) ₁₈	36	perfekt	17
19	MR32	(GA) ₄₃	86	perfekt	18 (Ankerprimer)
20	MR36	poly GA, Sekundärstruktur	ca. 70	n. b.	19
21	MR37	(AG) ₇ TCCGACCGGTGAG(GA) ₁₃ A	52	imperfekt	20
22	MR38	(AG) ₂₂	44	perfekt	21
23	MR42	(AC) ₁₄ (AT) ₇ CTC(AT) ₅	55	zusammengesetzt + imperfekt	Ta zu niedrig
24	MR45	(AG) ₆ AT(AAG) ₄ ATG(AAG) ₆ AC(GGA) ₅ (AG) ₅	59	imperfekt	22
25	MR48	kein SSR	---	---	---

(Fett: für das Primerdesign verwendete SSRs, *) in VARGHESE et al. (2000) veröffentlicht, **) MR163.2: gekürzt durch Ankerprimer, Ursprungslänge ca. 250 bp.)

Anhang C: Übersicht über alle identifizierten SSR-Klone (Fortsetzung)

Nr.	Klon	SSR	SSR-Länge [bp]	SSR-Art	SSR-Primer
26	MR49	poly CT, Sekundärstrukturen	ca. 40	n. b.	23
27	MR51	(AG) ₁₄	28	perfekt	24
28	MR53	(AG) ₂₈	56	perfekt	25
29	MR54	(CT) ₂ GT(CT) ₁₅ ATGTCGTTATTGTACGGT(CT) ₄ GCTACTATGT - (CT) ₅ GGTATTGAT ₄ (GT) ₂ (CT) ₃	110	imperfekt	26
30	MR57	kein SSR	---	---	---
31	MR60	kein SSR	---	---	---
32	MR61	(GA) ₁₂ T(GA) ₃₀	85	imperfekt	27
33	MR62	(GA) ₂ GGG(GA) ₇ GCCGT(GCG) ₃ AG(GA) ₄ G ₅ TGTCGGCGAG(GA) ₇ GC GA(CG) ₃ GG(GA) ₆ A(GA) ₅	108	imperfekt	Ta zu hoch
34	MR63	kein SSR	---	---	---
35	MR64	(GA) ₂₀	40	perfekt	28
36	MR65	kein SSR	---	---	---
37	MR66	kein SSR	---	---	---
38	MR68	poly CT, Sekundärstrukturen	ca. 75	n. b.	---
39	MR70	kein SSR	---	---	---
40	MR74	(GA) ₂ GG(GA) ₇ GCCGTGCGACCGCGAG(GA) ₅ GGAGC GA(CG) ₃ - G(GA) ₆ A(GA) ₄ GG	83	imperfekt	29
41	MR77	kein SSR	---	---	---
42	MR83	(GA) ₁₈	36	perfekt,	30
		TGT(TTG) ₅ TGG(TG) ₄ T	30	zusammengesetzt + imperfekt	31
43	MR86	AA(AG) ₂ AA(AG) ₆ GGAGGG(AG) ₇ (AC) ₂ (AG) ₅ AA(AG) ₄ AAAG	68	imperfekt	32
44	MR90	poly CT, Sekundärstruktur	ca. 100	n. b.	---
45	MR91	kein SSR	---	---	---
46	MR92	(CT) ₁₅	30	perfekt	33
47	MR93	kein SSR	---	---	---
48	MR94	kein SSR	---	---	---
49	MR95	(AG)17ATG(AG)2	41	imperfekt	34

(Fett: für das Primerdesign verwendete SSRs, *) in VARGHESE et al. (2000) veröffentlicht, **) MR163.2: gekürzt durch Ankerprimer, Ursprungslänge ca. 250 bp.)

Anhang C: Übersicht über alle identifizierten SSR-Klone (Fortsetzung)

Nr.	Klon	SSR	SSR-Länge [bp]	SSR-Art	SSR-Primer
50	MR97	(AG) ₂₉ (GA) ₄	58 8	perfekt perfekt	35
51	MR99	kein SSR	---	---	---
52	MR100	(GA) ₁₉ TAGAC(GA) ₁₂	67	imperfekt	36
53	MR101	(CT) ₁₃	26	perfekt	37
54	MR102	(AG) ₃₇ (AAG) ₃ G(GA) ₄	92	imperfekt	38
55	MR103	(AG) ₄₂	84	perfekt	39
56	MR104	(GA) ₃₃	66	perfekt	40
57	MR106	(CA) ₁₃	26	perfekt	41
58	MR107	(GA) ₂₇	54	perfekt	42
59	MR108	(GA) ₁₃ + (AGAAAG) ₂ (GA) ₁₃	26 + 38	perfekt, zusammengesetzt	43 (enthält 2 SSRs)
60	MR109	(GA) ₁₁ (TA) ₂ CA(GA) ₁₃	54	imperfekt	Ta zu niedrig
61	MR110	(AG) ₂₆ TAGATCT(GA) ₃	65	imperfekt	44
62	MR111	AA(AAG) ₂₇ GG	58	perfekt	45
63	MR112	kein SSR	---	---	---
64	MR113	(CT) ₁₅	30	perfekt	46
65	MR115	(CT) ₁₈	36	perfekt	47
66	MR116	(GA) ₁₇ GGAGG(AG) ₄ ATAGANNGGG(AG) ₁₂	81	imperfekt	48
67	MR119	(AG) ₂₂	44	perfekt	49
68	MR122	(GA) ₂₁	42	perfekt	50
69	MR123	GAG(GA) ₁₇	37	perfekt	51
70	MR127	CT dispersed, Sekundärstruktur	ca. 90	imperfekt	52
71	MR128	(AG) ₇ A(AG) ₄ G(AG) ₉ A(AG) ₈ AT(AG) ₇	75	imperfekt	53
72	MR129	(CT) ₂₀	40	perfekt	54
73	MR132	(GA) ₁₇	34	perfekt	55 (Ankerprimer)
74	MR133	C(CT) ₂ CC(CT) ₆ CCTC (GA) ₁₀ TGGAA(TA) ₂ AGAA(GA) ₁₉	23 71	imperfekt imperfekt	56 57

(Fett: für das Primerdesign verwendete SSRs, *) in VARGHESE et al. (2000) veröffentlicht, **) MR163.2: gekürzt durch Ankerprimer, Ursprungslänge ca. 250 bp.)

Anhang C: Übersicht über alle identifizierten SSR-Klone (Fortsetzung)

Nr.	Klon	SSR	SSR-Länge [bp]	SSR-Art	SSR-Primer
75	MR135	kein SSR	---	---	---
76	MR136	(AT) ₂₈	56	perfekt	58
77	MR138	CT dispersed	ca. 250	imperfekt	SSR zu groß (ca. 250 bp)
78	MR139	(CT) ₄ AT(CT) ₂ AT(CT) ₄ CC(CT) ₂ CC(CT) ₅ C ₄ (CT) ₂ GT(CT) ₅	62	imperfekt	59 (Ankerprimer)
79	MR140	(GA) ₁₂	24	perfekt	60
		AAGCGCAGAAAG ₄ C(AAG) ₂ CAAG	25	imperfekt	61
80	MR143	CT-Motiv, Sekundärstruktur	ca. 50	---	---
81	MR144	(CT) ₁₁	22	perfekt	62
82	MR146	(CT) ₁₄	28	perfekt	124*
83	MR148	(GA) ₂₀ CA(GA) ₇	56	imperfekt	63
84	MR152	CT dispersed, Sekundärstruktur	ca. 100	imperfekt	---
85	MR153	(AG) ₂₈	56	perfekt	64
86	MR154	kein SSR	---	---	---
87	MR155	(CA) ₁₃	26	perfekt	65
88	MR156	(TG) ₁₂	24	perfekt	66
89	MR157	(CT) ₁₅ TT(CT) ₄ C (TA) ₃ GGTGTTTTACTTA) ₆ TCTAT	41	imperfekt	125*
			33	imperfekt	67
			68	perfekt	68
90	MR158	(CT) ₃₄	68	perfekt	68
91	MR159	kein SSR	---	---	---
92	MR160	(AG) ₈ GG(AAG) ₁₁	40	imperfekt	69
93	MR161	kein SSR	---	---	---
94	MR162	(CTT) ₃ CAT(CTT) ₂	18	imperfekt	70
95	MR163	(AG) ₄ GG(AAG) ₂ GG(AAG) ₂ GG(AAG) ₆ G G(GA) ₃₆ G ₄ (GA) ₄ CTTACCAAT(AAG) ₂ CTT(GA) ₃ GG(GA) ₃ CTGCCGT- (GA) ₅ TG ₃ TTC(GA) ₅ ACTCTGT(GA) ₆ TG ₃ TTC(GA) ₆ G ₃ CT(GA) ₄	41	imperfekt	72
			204**	imperfekt	71
96	MR165	GG(GA) ₃ GGATTTC(GA) ₄ TTC(GA) ₃ NA(GA) ₄ NNNA(GA) ₄ A, Sekundärstruktur	53	imperfekt	---

(Fett: für das Primerdesign verwendete SSRs, *) in VARGHESE et al. (2000) veröffentlicht, **) MR163.2: gekürzt durch Ankerprimer, Ursprungslänge ca. 250 bp.)

Anhang C: Übersicht über alle identifizierten SSR-Klone (Fortsetzung)

Nr.	Klon	SSR	SSR-Länge [bp]	SSR-Art	SSR-Primer
97	MR166	(AG) ₁₀ AC(AG) ₇	36	imperfekt	73
98	MR167	kein SSR	---	---	---
99	MR168	(CT) ₁₄ C	29	perfekt	74
100	MR172	(AG) ₁₆ G(TA) ₂ GGCTTAG(CT) ₂ ACGA(AG) ₃ A(AG) ₆	71	imperfekt	75
101	MR173	(AG) ₁₈	36	perfekt	76
102	MR174	(GA) ₁₃	26	perfekt	126*
103	MR176	(GA) ₅ TTATG(GA) ₃ A (GA) ₆ (TCTT) ₆	22 12 24 59	imperfekt perfekt perfekt imperfekt	--- --- --- 77
104	MR177	(AG) ₁₄ ATG(AG) ₁₁ AT(AG) ₂	---	---	repetitiv
105	MR178	CT-Motive, durchgehend, entspricht MR178	---	---	---
106	MR179	GA-Motive, durchgehend, entspricht MR177	---	---	---
107	MR180	(AG) ₆ GGAGG(AG) ₆ AA(AG) ₅ AA(AG) ₄	52	imperfekt	78
108	MR181	kein SSR	---	---	---
109	MR185	(AC) ₁₁ (AT) ₉ (AG) ₂₂	40 44	zusammengesetzt perfekt	Ta zu niedrig 79
110	MR190	kein Insert	---	---	---
111	MR191	(CT) ₂ C ₃ T ₃ (CT) ₃ TGCGCAG(TC) ₈ N ₁₆ (TC) ₃ CTCGACGTCGC(CT) ₅ C- GCCGTCGCACG(CT) ₅ CTGCCGGCGC(TG) ₂ (TGG) ₁ TG, Sekundärstruktur	129	zusammengesetzt + imperfekt	80
112	MR193	(GT) ₄ GC(GT) ₂	14	imperfekt	81
113	MR194	(AG) ₇ GG(AG) ₂ CTGCCGTG(AG) ₂₅ entspricht MR193	77	imperfekt	82
114	MR196	(GT) ₁₂	24	perfekt	83
115	MR197	(AC) ₁₁	22	perfekt	84
116	MR198	GA-Motive, durchgehend	---	---	repetitiv

(Fett: für das Primerdesign verwendete SSRs, *) in VARGHESE et al. (2000) veröffentlicht, **) MR163.2: gekürzt durch Ankerprimer, Ursprungslänge ca. 250 bp.)

Anhang C: Übersicht über alle identifizierten SSR-Klone (Fortsetzung)

Nr.	Klon	SSR	SSR-Länge [bp]	SSR-Art	SSR-Primer
117	MR199	(ATA) ₇ TA(ATA) ₂ (TA) ₇ A(TA) ₆ T(TA) ₂ + (ATA) ₁₂ (TG) ₂ AGTGTA(TG) ₁₂	29 32 + 36 34	imperfekt imperfekt + perfekt imperfekt	85 86 (enthält 2 SSRs) 87
118	MR201	(TG) ₁₀	20	perfekt	88
119	MR202	(AC) ₁₀	20	perfekt	89
120	MR203	(AG) ₂₁ ACTTACCAAT(AG) ₂ CTT(GA) ₃ GG(GA) ₃ CTGC GT(GA) ₅ T- G ₃ TTG(GA) ₅ (CT) ₂ GT(GA) ₆ TG ₃ TTG(GA) ₆ CTGCCCT(GA) ₆ CA(GA) ₄ - G ₃ CT(GA) ₄ (AG) ₇ GG(AG) ₂ (GA) ₃₂	184 20 64	imperfekt imperfekt perfekt	90 91 92
121	MR206	(GA) ₃₂	20	imperfekt	91
122	MR209	(TC) ₅ TG(TA) ₆ GCGTGCAATGC(GT) ₁₃	60	perfekt	92
123	MR210	(AC) ₁₅ AT(ACT) ₃ (AT) ₇	52	zusammengesetzt + imperfekt	93
124	MR211	(GT) ₉	18	perfekt	94
125	MR212	kein SSR	---	---	95
126	MR213	(AC) ₄ ATA(AC) ₃ ATCCCTGAG(AC) ₁₂ (AT) ₂₁	92	imperfekt	96
127	MR216	(AG) ₂₆	52	perfekt	97
128	MR218	(CA) ₁₀	20	perfekt	98
129	MR228	(AG) ₁₄	28	perfekt	99
130	MR229	CT dispersed, Sekundärstruktur	ca. 110	imperfekt	100
131	MR230	poly CT, Sekundärstruktur	ca. 35	n. b.	101
132	MR231	T(TC) ₂ TG(TC) ₁₅ TATGTCGTTATTGTAACGG(TC) ₄ TGGTACTA- (TC) ₃ TG(TC) ₂ TGGTATTGAT ₃ (TG) ₂ (TC) ₃ T	112	imperfekt	102
133	MR263	(AC) ₃ TC(AC) ₁₄	36	imperfekt	103
134	MR279	(CT) ₆ T ₂ (CT) ₂ CCTAT(CT) ₂ C	28	imperfekt	104
135	MD2	(AG) ₂₀	40	perfekt	105
		T ₂₈	28	perfekt	106

(Fett: für das Primerdesign verwendete SSRs, *) in VARGHESE et al. (2000) veröffentlicht, **) MR163.2.: gekürzt durch Ankerprimer, Ursprungslänge ca. 250 bp.)

Anhang C: Übersicht über alle identifizierten SSR-Klone (Fortsetzung)

Nr.	Klon	SSR	SSR-Länge [bp]	SSR-Art	SSR-Primer
136	MD19	(GA) ₃ AGGAAG(GA) ₂ A(GA) ₁₃	42	imperfekt	107
137	MD20	T ₁₉ (AG) ₆ AT(AG) ₆	19	perfekt	108
138	MD21	(AG) ₁₃	32	imperfekt	109
139	MD22	(GA) ₁₁	26	perfekt	110
140	MD37	CT-Motive, durchgehend	22	perfekt	111
141	MD38	(CT) ₁₂	---	---	repetitiv
142	MD39	(CT) ₁₂ AT(CT) ₁₉	24	perfekt	127*
143	MD40	kein SSR	64	imperfekt	112
144	MD41	(GA) ₁₀ A(GA) ₃	---	---	---
144	MD41	(AG) ₁₅	45	imperfekt	128*
145	MD42	kein SSR	30	perfekt	113
146	MD43	kein SSR	---	---	---
147	MD45	kein Insert	---	---	---
148	MD46	(TC) ₁₅	---	---	---
149	MD49	GAG(GA) ₅ GCCGTGCGACCGCGAG(GA) ₅ GCCGACCGCGAG(GA) ₅ GC- GT(CG) ₅ G(GA) ₆ GCGT(CG) ₃ G(GA) ₆ A(GA) ₅ A(GA) ₅ CG(GC) ₂ AA(GA) ₅ - AAGGG (AG) ₂	30	perfekt	129*
150	MD50	(GA) ₃₅	146	imperfekt	Ta zu hoch
151	MD51	(GAG) ₂ AGG(GA) ₅ GCGACCGCGAG(GA) ₅ GG(GA) ₂ GCGACG(GC) ₂ - (GGA) ₂ GG(GA) ₂ GCGACG(GC) ₂ (GGA) ₂ (GA) ₄ (GAA) ₂ (GA) ₄ CGGCG- CAT(GA) ₆ GCTCGA	70	perfekt	114
152	MD52	(AG) ₁₅	132	imperfekt	Ta zu hoch
153	MD53	(CT) ₈ (CCA) ₂ (TC) ₂ TCACGC(CT) ₃ TCAGCA(TC) ₁₀	30	perfekt	115
154	MD55	(AC) ₁₃	64	imperfekt	116
155	MD56	(CT) ₁₅	26	perfekt	117
156	MD58	AA(AG) ₃ A	30	perfekt	118 (Ankerprimer)
			65	perfekt	119 (Ankerprimer)

(Fett: für das Primerdesign verwendete SSRs, *) in VARGHESE et al. (2000) veröffentlicht, **) MR163.2.: gekürzt durch Ankerprimer, Ursprungslänge ca. 250 bp.)

Anhang C: Übersicht über alle identifizierten SSR-Klone (Fortsetzung)

Nr.	Klon	SSR	SSR-Länge [bp]	SSR-Art	SSR-Primer
157	MD59	(CT) ₁₆	32	perfekt	120
158	MD60	(AG) ₁₈	36	perfekt	121
159	MD61	Klon entspricht MD60	---	---	---
160	MD72	(GT) ₁₀	20	perfekt	122
161	MD92	(TC) ₂₆	52	perfekt	123 (Ankerprimer)
162	MD132	kein Insert	---	---	---

(Fett: für das Primerdesign verwendete SSRs, *) in VARGHESE et al. (2000) veröffentlicht, **) MRI63.2: gekürzt durch Ankerprimer, Ursprungslänge ca. 250 bp.)

7.4 Anhang D: Allele der mit SSR-Primerpaaren amplifizierten Loci

Name	Allele/ Locus AACG-Genom [bp]	Allele/ Locus AA-Genom [bp]	Allele/ Locus CC-Genom [bp]	Allele/ Locus BB-Genom [bp]
MR1	150	150	150	150
MR3	226/ 230/ 232/ 0*	226/ 228/ 0*	234/ 0*	---**
MR5	157	157	157	157
MR8.1a	202/ 204	202	202	202
MR8.1b	---**	---**	115	---**
MR12a	145/ 147/ 149/ 151/ 153/ 0*	147/ 151/ 0*	---**	153
MR12b	157	---**	157/ 159	---**
MR13a	155/ 0*	157/ 0*	---**	---**
MR13b	165/ 167/ 173/ 0*	167/ 0*	165/ 171	---**
MR14a	128/ 130/ 134/ 136/ 146	130/ 134	130/ 134	---**
MR14b	---**	---**	80/ 84/ 96	90
MR16	196/ 198	196	196	---**
MR17a	855	85	85	85
MR17b	153/ 0*	---**	---**	---**
MR17c	---**	---**	---**	147
MR18	248/ 250/ 252/ 254	252	252	242/ 252/ 258
MR21a	154/ 162/ 164/ 166	158/ 162/ 166	164	158/ 160/ 164
MR21b	171/ 179/ 181/ 0*	171/ 173/ 175/ 181	171/ 181	167/ 171/ 181
MR22	163/ 165	159/ 163/ 165	163/ 171/ 181	161/ 165/ 171/ 181
MR25a	170	170	---**	---**
MR25b	187	---**	187	---**
MR26a	171	171	173	171/ 173
MR26b	183	---**	181/ 183/ 185	181/ 183
MR29a	209/ 229/ 0*	201	215/ 227/ 0*	205/ 227/ 0*
MR29b	245/ 249/ 253/ 255/ 0*	---**	249/ 0*	---**
MR29c	260/ 262/ 264/ 266/ 0*	---**	---**	---**
MR29d	295/ 299/ 305/ 307 309/ 311/ 0*	---**	305/ 0*	---**
MR30	151	151	151	151
MR32a	123/ 0*	123	123	---**
MR32b	142/ 0*	142	142	---**
MR32c	---**	---**	---**	97
MR36a	97/ 0*	97/ 0*	97/ 99/ 0*	103/ 0*
MR36b	137/ 139/ 141/ 143/ 0*	135/ 137	129/ 131	133/ 145
MR37a	127	---**	127/ 129	127
MR37b	129/ 131/ 133	---**	129/ 0*	---**
MR37c	139/ 141	139	---**	---**
MR37d	147	147/ 0*	147/ 0*	147/ 0*
MR37e	151	---**	151	---**
MR37f	155	---**	155	155/ 0*
MR37g	172	---**	172	---**
MR38	119/ 123/ 147/ 149/ 157	123	123	123
MR45	131	131	131	131/ 133
MR49a	169/ 0*	169	---**	---**
MR49b	200/ 202/ 204/ 208/ 210/ 212/ 214/ 0	204/ 214/ 0*	182/ 208/ 236	202/ 208
MR51a	145/ 147/ 149/ 151/ 0*	151/ 0*	151/ 0*	---**
MR51b	153	---**	153	---**
MR51c	163/ 165	163/ 165	---**	165
MR53a	169/ 171/ 0*	169/ 177/ 179	171	171/ 173/ 183
MR53b	212/ 214/ 216/ 218/ 0*	204/ 0*	---**	---**
MR54a	76/ 0*	76	76/ 0*	76/ 0*
MR54b	219/ 221	219/ 221	219	219/ 0*
MR54c	---**	---**	293/ 301	305
MR61	160/ 162/ 164/ 166/ 178	156/ 170/ 0*	122/ 146/ 154/ 162	122/ 154/ 168

(0*: Nullallel, ---**: Locus durchgehend nicht amplifiziert)

Anhang D: Allele der mit SSR-Primerpaaren amplifizierten Loci (Fortsetzung)

Name	Allele/ Locus AACC-Genom [bp]	Allele/ Locus AA-Genom [bp]	Allele/ Locus CC-Genom [bp]	Allele/ Locus BB-Genom [bp]
MR64a	81	81	81	81
MR64b	247/ 249/ 251/ 253/ 0*	249	249/ 257	249/ 0*
MR64c	280/ 282/ 0*	---**	282	282/ 288/ 292
MR64d	---**	---**	236/ 0*	---**
MR74a	78	78/ 80	78	76/ 78
MR74b	123	123/ 125	123	121/ 123/ 125
MR74c	199	199/ 205/ 207	199/ 197	199/ 205
MR83.1a	195	195	195	189/ 195/ 0*
MR83.1b	215	221/ 0*	213/ 215	203/ 207/ 0*
MR83.2a	131	131	131	---**
MR83.2b	153	153	153	153
MR86a	112	112	112	110/ 112/ 114
MR86b	157	---**	157	---**
MR92	210/ 212/ 214/ 230/ 232/ 234	---**	214/ 240	---**
MR95a	205/ 207	207	205/ 207/ 0*	205/ 207/ 0*
MR95b	223	233/ 0*	223/ 0*	223
MR97	139/ 141/ 143/ 145/ 147/ 149	139/ 141/ 147	129/ 131/ 139/ 141	89/ 133/ 145
MR101a	140/ 144/ 0*	140/ 138	144	---**
MR101b	150/ 152/ 0*	---**	---**	---**
MR102a	112/ 0*	106/ 0*	112	---**
MR102b	153	153	153	153
MR103	101	101	99/ 101	101
MR104a	118	118	122	116/ 118
MR104b	169/ 171/ 173/ 175/ 177/ 179	---**	171/ 0*	---**
MR106a	192	192	192	190/ 192
MR106b	178/ 0*	---**	---**	---**
MR107	95	95	95	95
MR108a	118/ 0*	---**	---**	---**
MR108b	178/ 184/ 186/ 188/ 192/ 198/ 220	---**	---**	---**
MR110a	181	181	181	---**
MR110b	192/ 194/ 196/ 198/ 200/ 0*	192/ 194	192/ 200/ 202	---**
MR111a	102/ 0*	---**	---**	102/ 0*
MR111b	106	106/ 0*	110/ 112/ 116/ 118	118/ 0*
MR113a	220/ 222/ 224/ 0*	220	---**	220/ 0*
MR113b	242/ 244/ 248/ 0*	234/ 254	238/ 240/ 270	234/ 270/ 0*
MR115	214/ 218/ 224/ 226/ 228	---**	218/ 220	---**
MR116	125/ 127/ 129	127/ 129	127/ 0*	---**
MR119a	250	250	250	250
MR119b	259/ 261/ 277/ 291	261/ 263/ 277	261/ 0*	279/ 0*
MR122a	156	156	---**	---**
MR122b	226	226	---**	---**
MR123	167/ 169/ 173/ 175/ 177/ 183	167/ 175/ 0*	123/ 153/ 163	153/ 165
MR127	158	154/ 158	140/ 152/ 160	152/ 154/ 160
MR129	283/ 285/ 287/ 289	279/ 281/ 285	293/ 295/ 297	277/ 279/ 283
MR132	83/ 85/ 87/ 99/ 101/ 107	---**	81/ 0*	---**
MR133.1	237	237/ 245	231/ 245/ 0*	237/ 241/ 251
MR133.2	105/ 121/ 123/ 125/ 129/ 131/ 133	121/ 131/ 135	105/ 111/ 133/ 0*	75/ 77/ 105/ 0*

(0*: Nullallel, ---**: Locus durchgehend nicht amplifiziert)

Anhang D: Allele der mit SSR-Primerpaaren amplifizierten Loci (Fortsetzung)

Name	Allele/ Locus AACC-Genom [bp]	Allele/ Locus AA-Genom [bp]	Allele/ Locus CC-Genom [bp]	Allele/ Locus BB-Genom [bp]
MR136	239	239	239	239
MR139a	132/ 134/ 0*	128/ 132/ 134	---**	---**
MR139b	94/ 0*	110/ 0*	---**	---**
MR140.1	121/ 123	121	121/ 129/ 249	121/ 129/ 0*
MR140.2	105/ 0*	105	105	105
MR144	118/ 123	120/ 123	114/ 116	112/ 114/ 116
MR148a	232/ 0*	---**	223	---**
MR148b	268/270/272/274/ 0*	---**	268	---**
MR153	166/ 176/ 192/ 194/ 196/ 200/ 204/ 206	164/ 166/ 200	162/ 164/ 168	152/ 162
MR155a	93	93	---**	---**
MR155b	166/ 168/ 170/ 172	168/ 172	172/ 0*	166/ 0*
MR155c	176/ 0*	176	176/ 0*	176/ 0*
MR156a	173/ 179/ 0*	179	173	175/ 177/ 179
MR156b	190/ 192/ 194/ 196/ 0*	192/ 0*	---**	188
MR157.2	282	282	---**	---**
MR158a	164/ 166/ 170/ 172/ 174/ 176/ 178/ 182/ 184/186/ 188/ 253	174/ 176/ 184	184/ 0*	160/ 184
MR158b	253/ 0*	253	253	---**
MR160a	95/ 0*	---**	95/ 0*	---**
MR160b	260/ 0*	260	---**	230
MR160c	---**	---**	---**	230
MR162a	98/ 0*	---**	---**	98
MR162b	106	106	106	106
MR163	183	183/ 0*	183/ 0*	---**
MR163.2a	116/ 0*	116/ 118/ 0*	---**	114/ 0*
MR163.2b	139/ 141/ 143/ 0*	139/ 141	137/ 0*	---**
MR163.2c	150/ 0*	---**	150/ 0*	---**
MR163.2d	161/ 163/ 165/ 167/ 169/ 171/ 173/ 175/ 181	165/ 169/ 173	161/ 171/ 181	167/ 0*
MR166a	---**	183/ 0*	181	---**
MR166b	174/ 204/ 206/ 210/ 0*	200/ 204/ 206	---**	---**
MR168	83	79/ 83/ 85	79/ 83/ 85	79/ 85
MR172	215/ 217/ 219/ 221/ 223/ 225	213/ 219/ 225	219/ 0*	---**
MR173a	82/ 84	82/ 0*	80/ 82	---**
MR173b	163/ 0*	163/ 0*	163/ 0*	163
MR173c	209/ 0*	---**	209/ 0*	---**
MR176a	98/ 100	---**	98/ 0*	96
MR176b	142/ 146/ 148/ 150/ 156/ 170	140/ 148/ 150/ 156	144/ 156/ 0*	---**
MR191.1	130	130	130	130/ 132
MR193a	133	133	133/ 0*	133
MR193b	139/ 149/ 0*	---**	139	---**
MR193c	160/ 162/ 164/ 166/ 168/ 170/ 172/ 174/ 176/ 178/ 184	162/ 166/ 168/ 172/ 176	164/ 166	162/ 166/ 172
MR196	147/ 149/ 151	151	149/ 151	---**
MR197a	123/ 147	123/ 147/ 151	145	145/ 0*
MR197b	156	165/ 0*	154/ 0*	---**
MR199.1a	124/ 126/ 128	---**	124/ 126	---**
MR199.1b	240	---**	240	---**

(0*: Nullallel, ---**: Locus durchgehend nicht amplifiziert)

Anhang D: Allele der mit SSR-Primerpaaren amplifizierten Loci (Fortsetzung)

Name	Allele/ Locus AACC-Genom [bp]	Allele/ Locus AA-Genom [bp]	Allele/ Locus CC-Genom [bp]	Allele/ Locus BB-Genom [bp]
MR199.3	128	126/ 128/ 0*	---**	---**
MR201	283	269/ 183	283	---**
MR202a	111	111	111	109
MR202b	119	119/ 121/ 125	117/ 119	119/ 121/ 0*
MR203.2a	74/ 0*	74	74/ 0*	74
MR203.2b	98/ 0*	98/ 0*	98/ 0*	---**
MR203.2c	108/ 0*	108/ 0*	---**	---**
MR203.2d	125/ 127/ 129/ 131/ 133/ 135/ 137	131/ 133	129/ 123	125/ 127
MR206	148	148	148	148
MR209	153	153	153	153
MR211a	197/ 0*	---**	197/ 0*	---**
MR211b	204/ 0*	204/ 0*	---**	---**
MR211c	241/ 243/ 245/ 0*	243/ 245/ 0*	241/ 245/ 247/ 251	---**
MR213a	160/ 0*	---**	160/ 164	---**
MR213b	166	166	---**	166/ 0*
MR216a	79/ 81	75/ 85	79/ 83	79/ 81/ 85
MR216b	103/ 105/ 113/ 115/ 117/ 119/ 121	89/ 99/ 123	107/ 0*	---**
MR216c	130/ 132/ 0*	---**	130/ 0*	---**
MR218	103	---**	103	101/ 107/ 0*
MR228	79/ 81/ 83/ 87/ 88/ 90/ 92/ 95	79	79/ 81/ 92	79/ 81/ 92
MR229a	186/ 188/ 194/ 196/ 198/ 200/ 202/ 204/ 206/ 0*	196/ 200/ 204	186/ 0*	184/ 188/ 200
MR229b	209/ 211/ 213/ 215/ 217/ 219/ 221	213/ 217/ 219	219/ 273/ 275	215/ 219/ 221
MR230	166/ 168/ 170	166/ 168/ 174	---**	---**
MR231a	216	216	216/ 0*	216/ 0*
MR231b	---**	202/ 204/ 208	---**	---**
MR263a	89	89	89	89
MR263b	146	146	146	146
MR279a	111/ 0*	111	107/ 111/ 113/ 117	107/ 113
MR279b	118	118	118/ 120/ 124/ 0*	118/ 120/ 0*
MR279c	---**	89/ 0*	---**	---**
MD2.1	190/ 192/ 204/ 206	206/ 0*	188/ 204	204/ 0*
MD2.2a	125/ 127	123/ 125	---**	125/ 129
MD2.2b	---**	---**	131/ 133	---**
MD2.2c	136/ 138/ 0*	---**	---**	---**
MD2.2d	---**	---**	90/ 0*	---**
MD19.1a	140/ 142	140/ 0*	140/ 142	---**
MD19.1b	---**	124/ 126	---**	---**
MD19.2	220/ 222	222	222	---**
MD20a	168/ 170/ 172	168/ 174	174/ 0*	166/ 174/ 176
MD20b	---**	---**	181/ 189/ 0*	181/ 0*
MD21a	267/ 269/ 271	---**	267	---**
MD21b	273/ 275/ 277	273/ 275/ 0*	---**	---**
MD21c	283/ 0*	281	283/ 0*	283/ 0*
MD22	140/ 142	140/ 142	142/ 146	---**
MD38.2	110	98/ 0*	110	---**
MD41a	80	80	80	80
MD41b	90/ 0*	90/ 94	---**	94/ 0*

(0*: Nullallel, ---**: Locus durchgehend nicht amplifiziert)

Anhang D: Allele der mit SSR-Primerpaaren amplifizierten Loci (Fortsetzung)

Name	Allele/ Locus AACC-Genom [bp]	Allele/ Locus AA-Genom [bp]	Allele/ Locus CC-Genom [bp]	Allele/ Locus BB-Genom [bp]
MD41c	96/ 98/ 100/ 0*	98/ 100	---**	96/ 100
MD41d	104	---**	---**	---**
MD50a	89/ 0*	89	89	91
MD50b	146/ 148/ 158	146/ 0*	158/ 0*	158/ 0*
MD52a	77	77	77	77
MD52b	127	127	127	127
MD52c	149	149	149	149
MD53	151/ 153/ 155	153/ 199	---**	---**
MD55a	147/ 0*	---**	147/ 0*	---**
MD55b	158/ 160/ 162/ 0*	162/ 0*	---**	---**
MD55c	283	283/ 0*	---**	---**
MD56	172	172/ 176/ 234	150/ 170/ 182/ 194	182/ 146/ 0*
MD58	115	115/ 0*	115/ 0*	115/ 0*
MD59a	222/ 224/ 244/ 0*	222/ 224/ 0*	---**	---**
MD59b	241	241	241	241
MD60a	112	112	112/ 0*	---**
MD60b	163/ 167/ 0*	157/ 161/ 163/ 165/ 173	---**	---**
MD72	96	84/ 0*	88/ 92/ 94/ 98	80/ 86/ 88

(0*: Nullallel, ---**: Locus durchgehend nicht amplifiziert)

Danksagung

Die experimentellen Arbeiten für die vorliegende Dissertation wurden in der Zeit vom Februar 1997 bis Dezember 2000 am Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung der Universität Göttingen durchgeführt und von der Norddeutschen Pflanzenzucht (NPZ), sowie dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) gefördert. Herrn Privatdozent Dr. Wolfgang Ecke danke ich für die Übernahme der Betreuung, seine zahlreichen Anregungen und seine Diskussionsbereitschaft. In der biologischen Fakultät wurde die Arbeit von Herrn Prof. Dr. H. W. Heldt betreut, wofür ich mich herzlich bedanken möchte. Außerdem danke ich Prof. Dr. R. Tischner für die Übernahme des Korreferats.

Dr. Milena Uzunova möchte ich vielmals für ihre vorangegangenen Arbeiten, die Einführung in dieses Thema und ihre zahlreichen Tips danken. Auch Dr. Carsten Knaak möchte ich für seine Hilfsbereitschaft und Zusammenarbeit danken.

Liebe Leute unseres Mikrokosmos, als da wären: Andreas Menze, Beatrix Seiffert, Bettina Onken, Jens C. Vaupel, Fernando Goffman, Anja Kramer, Brigitte Heberle, Milena Uzunova, Carsten Knaak, Christian Möllers, Johannes Hippe, Natascha Arnemann, Michael Wallbraun, Heike Trendelkamp, Isabel Bürgel, Knuth Weissleder, Marco Joneleit. Ich danke Euch tausendfach für Eure Aufmunterungen, Eure Unterstützung und so manches Eigentor beim Kickern.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung möchte ich an dieser Stelle für ihre Unterstützung danken. Ein besonderer Dank geht an Bettina, Andreas, Milena, Bea, Jens, Anja und Brigitte für alle gefundenen Rechtschreibfehler und an Lutz, der diese Arbeit jetzt bestimmt auswendig kennt. Bettina danke ich, nicht nur für ihre hilfreiche Hand im Labor, sondern auch für ihr geduldiges, offenes Ohr. Johannes, Uwe und Wolfgang sei gedankt dafür, daß so manches Mißverständnis zwischen meinem Computer und mir aus der Welt geschafft werden konnte. Mahmoud und Antje danke ich für die Unterstützung bei der Berechnung der genetischen Distanzen. Meinem Bruder Thomas danke ich für seine spontane Hilfe, als ich sie am nötigsten hatte.

Ein großer Dank geht an meine Geschwister für ihre Geduld und ihre zahlreichen Aufmunterungen in stundenlangen Telefongesprächen und an meine Eltern für ihre finanzielle und moralische Unterstützung während des gesamten Studiums, aber auch und besonders für den Rückhalt und die Sicherheit, die Ihr mir gegeben habt. Euch und Lutz – meinem Schnuffelbär – ist diese Arbeit gewidmet. Lutz, ich weiß nicht, wie ich Dir danken kann!

Lebenslauf

- 14.03.1965 geboren in Hamburg-Harburg
- 1971 – 1975 Besuch der Grundschule in Freiburg/ Elbe
- 1975 – 1986 Besuch des Gymnasiums der Vincent Lübeck Schule in Stade
- Juni 1986 Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife
- 1987 – 1989 Ausbildung zur Bürokauffrau bei der Kaufmännischen Krankenkasse Halle in Stade, mit dem Abschluß des Kaufmannsgehilfenbriefes
- April 1989 Beginn des Studiums der Biologie an der Universität Hamburg
- Oktober 1993 Vordiplomprüfung in den Fächern Biologie, Chemie, Physik
- Mai 1994 Mündliche Diplomhauptprüfung Biologie in den Fächern Molekularbiologie und Genetik, Botanik sowie Mikrobiologie
- Mai 1994 – März 1995 Anfertigung der Diplomarbeit mit dem Thema: „Korrelationen zwischen physiologischen und biochemischen Parametern bei der circadianen Rhythmik an *Chlamydomonas reinhardtii* D.“
- Mai 1995 – Januar 1997 Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Universität Göttingen am Institut für Biochemie der Pflanze
- seit 1997 Beginn der experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation unter Anleitung von Herrn Privatdozent Dr. W. Ecke am Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung der Universität Göttingen

