Jürgen Henrich

Erstellung segmentspezifischer molekularer Marker mittels Mikrodissektion und physikalische Kartierung der Resistenz gegen Schadinsekten (*Diatraea spp.*) bei tropischem Mais (*Zea mays* L.)

Aus dem Institut für
Pflanzenzüchtung, Saatgutforschung und Populationsgenetik
der Universität Hohenheim
Fachgebiet: Pflanzenzüchtung und Biotechnologie
Prof. Dr. G. Weber

Erstellung segmentspezifischer molekularer Marker mittels Mikrodissektion und physikalische Kartierung der Resistenz gegen Schadinsekten (*Diatraea spp.*) bei tropischem Mais (*Zea mays* L.)

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Agrarwissenschaften
vorgelegt der
Fakultät III - Agrarwissenschaften I -
der Universität Hohenheim

von
Dipl. - Agrarbiologe
Jürgen Henrich
aus Eberbach / Neckar
1999

Die vorliegende Arbeit wurde am 27. Januar 1999 von der Fakultät III - Agrarwissenschaften I - der Universität Hohenheim als “Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Agrarwissenschaften“ angenommen.

Tag der mündlichen Prüfung:	08. März 1999
Dekan:	Prof. Dr. A. E. Melchinger
Berichterstatter, 1. Prüfer:	Prof. Dr. G. Weber
Mitberichterstatter, 2. Prüfer:	Prof. Dr. A. Pfitzner
3. Prüfer:	Prof. Dr. C. Zebitz

Vorwort und Dank

Ich habe die vorliegende Arbeit in der Zeit von November 1994 bis September 1998 am Institut für Pflanzenzüchtung, Saatgutforschung und Populationsgenetik der Universität Hohenheim in Stuttgart, Fachbereich Pflanzenzüchtung und Biotechnologie - Prof. Dr. G. Weber, erstellt. Ich möchte Herrn Prof. Dr. G. Weber an dieser Stelle für die sehr interessante Themenstellung, die wissenschaftliche Betreuung sowie die stets vorhandene Diskussionsbereitschaft und das große Interesse an dieser Arbeit danken. Ein weiterer Dank geht in diesem Zusammenhang an Prof. Dr. A. Pfitzner für die Übernahme des Koreferates der Dissertation.

Herrn Dr. N. Ponelies möchte ich für die große Unterstützung bei der Erarbeitung und Durchführung verschiedenster molekularbiologischer Techniken danken. Auch waren die vielen wissenschaftlichen und nichtwissenschaftlichen Diskussionen stets eine große Bereicherung. Vielen Dank auch für die kritische Durchsicht des Manuskriptes der vorliegenden Arbeit.

Frau Dipl.-Biol. U. Born bin ich zu besonderem Dank verpflichtet. Sie hat durch ihre exzellente technische Assistenz, durch eine gute kommunikative Zusammenarbeit und nicht zuletzt durch ihr hohes persönliches Format einen wesentlichen Beitrag für ein angenehmes Arbeitsklima und damit zum Gelingen dieser Arbeit geleistet.

Bei Herrn Dipl.-Biol. R. Fleischer möchte ich mich ganz herzlich für die vielen anregenden Diskussionen, seine stete Hilfsbereitschaft und die hervorragende Zusammenarbeit im Labor bedanken.

Auch den beiden studentischen Hilfskräften C. Singrün und B. Weber danke ich für ihren unermüdlichen Fleiß bei der Betreuung der Pflanzen und Herstellung von Chromosomenpräparaten, sowie ihrer Unterstützung im Labor.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. G. Weber, die mir durch ihre kollegiale und gute Zusammenarbeit eine angenehme Zeit bereitet haben.

Für stete Diskussionsbereitschaft während der Arbeiten und Unterstützung bei der Durchsicht des Manuskriptes bedanke ich mich bei Herrn Dr. N. Stein, Herrn Dr. M. Bohn, Herrn Dr. T. Lübberstedt, Herrn PD Dr. G. Welz, Frau Dr. S. C. Kruse, sowie Herrn H. Thamm.

Danke auch an die Mitarbeiter des Institutes für Pflanzenzüchtung, Saatgutforschung und Populationsgenetik sowie der Landessaatzuchtanstalt für das angenehme Arbeitsklima während der letzten Jahre.

Das Projekt wurde von der Vater und Sohn Eiselen Stiftung, Ulm, finanziell unterstützt, wofür ich an dieser Stelle meinen besonderen Dank aussprechen möchte.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis i

Abkürzungsverzeichnis v

1. Einleitung 1

2. Material 6

2.1. Pflanzenmaterial 6

2.2. Bakterienstämme 6

2.3. Chemikalien 7

2.4. Nukleinsäuren 8

2.5. Enzyme 9

2.6. Reaktionssysteme 9

2.7. Verbrauchsmaterial 10

2.8. Geräte 10

2.9. Fotomaterial 11

3. Methoden 12

3.1. Pflanzenanzucht 12

3.2. Fixierung von Ausgangsmaterial zur Chromosomenpräparation 13

3.2.1. Antherenfixierung 13

3.2.2. Wurzelfixierung 13

3.3. Präparation von Chromosomen 13

3.3.1. Pachytänchromosomen 13

3.3.2. Mitotische Metaphasechromosomen 14

3.4. Mikrodissektion 16

3.4.1. Vorbereitung von Glasnadeln und Objektträgern 16

3.4.2. Isolierung von Chromosomensegmenten 16

3.5. Mikroamplifikation dissektierter Chromosomensegmente 17

3.5.1. Mikroamplifikation mittels Linkeradapter-PCR (LA-PCR) 17

3.5.1.1. Proteinase K-Behandlung 17

3.5.1.2. Restriktionsverdau und Linkeradapter-Ligation 17

3.5.1.3. Linkeradapter-PCR (LA-PCR) 18

3.5.2. Mikroamplifikation mittels ´*degenerate-oligonucleotide-primed*-PCR´ . 18

3.5.3. Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationen bei der PCR-Amplifikation 20
3.6. Standardtechniken 20
3.6.1. Restriktionsverdau 20
3.6.2. Agarosegelelektrophorese 20
3.6.3. DNA-Transfer nach SOUTHERN 20
3.6.4. Koloniefilter 21
3.6.5. Dot-Blot Filter 21
3.6.6. Markierung von DNA 21
3.6.6.1. Nicktranslation 21
3.6.6.2. PCR-Markierung 22
3.6.7. DNA-DNA Hybridisierung, nichtradioaktiv 22
3.6.8. DNA-DNA-Hybridisierung, radioaktiv 22
3.6.9. Aufreinigung von DNA-Fragmenten 23
3.7. Klonierung von LA-PCR-Produkten 23
3.7.1. Linearisierung und Dephosphorylierung von Plasmidvektoren 23
3.7.2. Ligation 24
3.7.3. Transformation 24
3.8. Herstellung von Linkeradaptern 24
3.9. DNA-Isolierung 25
3.9.1. Isolierung von Plasmid- und Cosmid-DNA 25
3.9.2. Isolierung genomischer Mais-DNA 25
3.10. Southern-Hybridisierung und genetische Kartierung von Klonen aus der Mikroamplifikation 26
3.11. Physikalische Kartierung molekularer Sonden 26
3.11.1. Analyse einer Cosmidbibliothek aus genomischer Mais-DNA 26
3.11.1.1. Sondenvorbereitung 27
3.11.1.2. Isolierung spezifischer Cosmidklone 27
3.11.2. Herstellung von Kompetitor-DNA für die *CISS*-Hybridisierung 28
3.11.2.1. *DNaseI*-Behandlung genomischer DNA 28
3.11.2.2. Herstellung von C_0t-1 DNA 29
3.11.3. Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) 30
3.11.3.1. Vorbereitung der Chromosomenpräparate 30

3.11.3.2. Vorbereitung der Sonden 30
3.11.3.3. Hybridisierung 31
3.11.3.4. Signaldetektion 31
4. Ergebnisse 33
4.1. Präparation und Identifikation von Chromosomen 33
4.1.1. Pachytänchromosomen 33
4.1.1.1. Ausgangsmaterial 33
4.1.1.2. Präparation 35
4.1.1.3. Identifikation 35
4.1.2. Mitotische Metaphasechromosomen 36
4.1.2.1. Ausgangsmaterial 36
4.1.2.2. Präparation 36
4.1.2.3. Identifikation 37
4.2. Optimierung der Mikroamplifikation dissektierter Chromosomensegmente . 38
4.2.1. Bestimmung der Herkunft von DNA-Kontaminationen in der LA-PCR . 38
4.2.1.1. Mikrodissektion und -amplifikation mittels LA-PCR 38
4.2.1.2. Klonierung des LA-PCR Produktes 40
4.2.1.3. Analyse der Amplifikationsprodukte und der rekombinanten Klone 40
4.2.2. Verminderung der Amplifikation von DNA-Kontaminationen 43
4.2.2.1. Modifizierung der Mikroamplifikation mittels LA-PCR 43
4.2.2.2. Mikroamplifikation mittels *´degenerate-oligonucleotide-primed-PCR´* 45
4.3. Mikroamplifikation mit optimiertem LA-PCR Protokoll 47
4.4. Analyse und Klonierung der Mikroamplifikationsprodukte 50
4.4.1. Relokalisation mittels *CISS*-Hybridisierung 50
4.4.2. Klonierung von LA-PCR Produkten 52
4.4.2.1. Transformation der LA-PCR Produkte zu segmentspezifischen DNA-Bibliotheken 53
4.4.2.2. Analyse der segmentspezifischen DNA-Bibliotheken 53
4.4.2.3. Bestimmung des Anteils B-chromosomenspezifischer Sequenzen in den Bibliotheken 55
4.4.3. Southern-Hybridisierungen vorselektierter Klone 56
4.5. Physikalische Kartierung molekularer Marker 59

4.5.1. Isolierung spezifischer Cosmidklone 59
4.5.2. *CISS*-Hybridisierung von Cosmidklonen 60
4.5.3. Vergleich zwischen genetischer Distanz und physikalischer Position molekularer Marker auf Chromosomen 65
5. Diskussion 68
5.1. Präparation, Mikrodissektion und -amplifikation von Chromosomen 68
5.1.1. Chromosomenmikrodissektion 68
5.1.2. Mikroamplifikation dissektierter Chromosomensegmente 70
5.2. Analyse und Klonierung der Mikroamplifikationsprodukte 74
5.2.1. Relokalisation mittels *CISS*-Hybridisierung 74
5.2.2. Erzeugung und Analyse segmentspezifischer DNA-Bibliotheken 75
5.3. Physikalische Kartierung molekularer Marker 79
5.3.1. *CISS*-Hybridisierung von Cosmidklonen zur physikalischen Kartierung 80
5.3.2. Vergleich zwischen genetischer und physikalischer Distanz molekularer Marker 82
5.4. Erstellung segmentspezifischer molekularer Marker mittels Mikrodissektion und physikalische Kartierung durch *CISS*-Hybridisierung? . . 84
6. Zusammenfassung 85
7. Literatur 88
Curriculum vitae 99

Abkürzungsverzeichnis

BAC	Bacterial artificial chromosome
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-Indolylphosphat
BMSC	Black Mexican sweet corn
bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
CFU	Colony forming unit (Anzahl Kolonien)
CIMMYT	Centro Internacional de Mejoramiento de Maiz y Trigo (Internationales Mais- und Weizenforschungsinstitut), Mexiko
CISS-Hybridisierung	Chromosomal *in situ* suppression - Hybridisierung
cM	centi-Morgan (Einheit der Rekombinationsfrequenz)
CML	CIMMYT Mais Linie
CSPD®	Disodium 3-(4-methodoxyspiro{1,2-dioxetan-3,2´-(5´-chloro)tricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decan}-4-yl) Phenylphosphat
CTAB	Hexadecyltrimethyl-ammoniumbromid
dATP	Desoxy-Adenosintriphosphat
dCTP	Desoxy-Cytosintriphosphat
dGTP	Desoxy-Guanosintriphosphat
DIG	Digoxygenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxy-ribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxy-Ribonukleosintriphosphat
DOP-PCR	Degenerate oligonucleotide primed - PCR (PCR mit degenerierten Oligonukleotidprimern)
dTTP	Desoxy-Thymidintriphosphat
dUTP	Desoxy-Uridintriphosphat
FISH	Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid

kb	Kilobasenpaare
LA-PCR	Linkeradapter - PCR
MAS	Marker assisted selection (markergestützte Selektion)
Mbp	Megabasenpaare
NBT	Nitroblau Tetrazoliumchlorid
NOR	Nukleolus organisierende Region
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumjodid
PMZ	Pollenmutterzelle
PNK	Polynukleotidkinase
QTL	Quantitative trait locus/loci (quantitative/r Merkmalsgen-ort/e)
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
SCB	Sugarcane borer (*Diatraea saccharalis* F.)
SDS	Sodium Dodecylsulfat
SWCB	Southwestern cornborer (*Diatraea grandiosella* D.)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer RNA
U	Unit, Einheit der Enzymaktivität
v.a.	vor allem
X-GAL	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-galaktosid
YAC	Yeast artificial chromosome

1. Einleitung

In tropischen und subtropischen Anbaugebieten der Erde ist Mais (*Zea mays* L.) ein wesentliches Grundnahrungsmittel der Menschen, oder spielt als Futtermittel für Hühner, Schweine und Wiederkäuer eine wichtige Rolle (CIMMYT, 1991). Doch verursachen die Larven des *´**s**outh**w**estern **c**orn **b**orer´* (SWCB), *Diatraea grandiosella* Dyar, und des *´**s**ugar**c**ane **b**orer´* (SCB), *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Pyralidae), erhebliche Ernteausfälle in Ländern Zentral- und Lateinamerikas. Jährlich wird der hierdurch hervorgerufene Ertragsverlust auf über 4 Millionen Tonnen in Brasilien und eine Million Tonnen in Mexiko geschätzt, was zusammen etwa 600 Millionen US Dollar entspricht (CIMMYT, 1988).

Beide Insekten sind bezüglich ihrer Lebenszyklen und ihres Fraßverhaltens sehr ähnlich, wobei bei vergleichbaren Entwicklungsstadien der SWCB als der aggressivere anzusehen ist. Während der SWCB auf Mais als Wirtspflanze angewiesen ist, weist der SCB ein breites Wirtspflanzenspektrum auf (Zuckerrohr, Mais, Reis, Sorghum, Wildgräser) (HINDERLITER, 1983). Die adulten Tiere legen ihre Eier während des Blattschiebens auf die Blätter der Maispflanzen ab. Nach dem Schlüpfen wandern die Larven in den Blattkelch, um sich dort von Blattgewebe zu ernähren. Zur weiteren Entwicklung und Verpuppung erfolgt nach neun bis zehn Tagen das Einbohren in den Pflanzenstengel. Nach 35 bis 50 Tagen entwickelt sich die zweite Generation adulter Tiere (BOHN *et al.*, 1996). In Abhängigkeit der geographischen Lage und der regionalen Bedingungen kann der SWCB zwei bis vier Generationen pro Jahr entwickeln. In den nördlichen und südlichen Grenzen seines Ausbreitungsgebietes wurden beim SCB vier bis fünf, in den tropischen Anbaugebieten bis zu sieben Generationen pro Jahr beobachtet (KRANZ *et al.*, 1977).

Zwar bieten pflanzenbauliche Maßnahmen wie z.B. eine umfangreiche Fruchtfolge oder der Einsatz von biologischem und chemischem Pflanzenschutz Möglichkeiten zur Verminderung des Befalls, doch ist letzterer nicht nur ökologisch bedenklich, sondern birgt u.a. durch geringe oder fehlende Kenntnisse bei der Anwendung ein gesundheitliches Risiko für die Landwirte. Durch den Einsatz insektenresistenter Sorten kann die Produktivität durch Verminderung von Ertragsverlusten aufgrund von Insektenbefall, sowie der damit einhergehen-

den Reduktion oder Vermeidung der Kosten für Insektizide gesteigert werden. Es kann zwischen verschiedenen Resistenzmechanismen gegen Insektenbefall unterschieden werden: **i)** liegt keine gezielte Präferenz vor, wird die Pflanzen für Eiablage, als Unterschlupf, oder Futterquelle nicht bevorzugt; **ii)** bei Antibiosis wird die Entwicklung der fressenden Insekten durch eine erhöhte Sterberate, reduzierte Gewichtszunahme, sowie durch verlangsamte morphogenetische Entwicklung negativ beeinflußt (PANDA UND KUSH, 1995); **iii)** Toleranz beschreibt die Fähigkeit einer resistenten Pflanze, Schädigungen bis zu einem gewissen Maße zu kompensieren, und dadurch gegenüber anfälligen Pflanzen einen Überlebensvorteil zu haben (PAINTER, 1951). Tolerante Pflanzen tragen somit trotz Befall zur Ertragsbildung bei. Zur Verbesserung der Resistenz von Maispflanzen gegen SWCB und SCB konzentrieren sich die Züchtungsstrategien auf die Antibiosis (MIHM, 1989). Das Ausmaß der Antibiosis kann entweder direkt durch Untersuchung von Parametern der Insektenentwicklung, oder indirekt durch Messung oder Bonitur des Fraßschadens an den Wirtspflanzen der Insekten bestimmt werden.

Resistenz gegen *Diatraea* spp. wurde in Maisgenotypen der karibischen Inseln (ELIAS, 1970) und in verschiedenen Populationen des Internationalen Mais- und Weizenforschungsinstitutes (CIMMYT), Mexiko, identifiziert (MIHM, 1985; MIHM *et al.*, 1991). Diese Resistenzeigenschaften, mit vorwiegend additiven Geneffekten, werden polygenisch vererbt (SCOTT UND DAVIES, 1978; HINDERLITER, 1983).

Die züchterischen Verbesserung von aktuellem Zuchtmaterial bezüglich quantitativ vererbter Resistenzeigenschaften ist durch verschiedene Strategien möglich. Hierbei beschreiben Methoden der direkten Selektion die Evaluierung des Resistenzniveaus der Genotypen durch Bestimmung der Antibiosis. Stehen hierfür natürliche Befallsstandorte nicht, oder nicht ausreichend zur Verfügung, bedient man sich der Möglichkeit einer künstlichen Infestierung. Hierzu werden Insekten angezogen, deren Larven im entsprechenden Entwicklungsstadium der Pflanze gezielt ausgebracht werden. Die damit verbundenen Probleme - arbeits- und zeitintensive Prüftechniken, sowie phytosanitäre Maßnahmen - können durch eine markergestützte Selektion (*´marker-assisted selection´*- MAS) als indirekte Selektionsmethode umgangen werden. Mit Hilfe molekularer Marker erfolgt eine Selektion auf genomische Regionen, die eine Insektenresistenz signifikant verbessern, ohne andere agronomisch wichtige Merkmale negativ zu beeinflussen (BOHN *et al.*, 1996; HOISINGTON *et al.*, 1996).

Voraussetzung für eine MAS ist die Lokalisation der beteiligten Gene, bzw. quantitativen Merkmalsloci (´*quantitative trait loci*´ - QTL). Durch die Entwicklung molekularer Marker, wie z.B. die Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLPs), wurde es möglich, komplexe, quantitativ vererbte Merkmale in ihre einzelnen Faktoren einzuteilen. In jüngster Zeit wurden quantitative Merkmalsloci für Resistenz gegen SWCB und SCB kartiert (BOHN *et al.*, 1996, 1997 a, b; BOHN, 1998; GROH *et al.*, 1998 a, b; KHAIRALLAH *et al.*, 1998), wodurch die Grundlage für eine MAS für Zünslerresistenz bei tropischem Mais gelegt wurde.

Bei diesen QTL-Kartierungsstudien wurden, je nach Kartierungspopulation (Ki3 × CML139, oder CML131 × CML67) und zugrundeliegendem Merkmal, eine unterschiedliche Anzahl von QTL mit unterschiedlich starken Effekten gefunden. Diese waren über das gesamte Genom verteilt. Die Autoren fanden eine gute Übereinstimmung der QTL Positionen für SWCB und SCB-Resistenz in der Kreuzung CML131 × CML67. Dies führte zu der Schlußfolgerung, daß die Resistenzen gegen beide Schadinsekten weitgehend die gleiche genetische Basis besitzen, wodurch eine MAS auf diese Genomregionen die Resistenzeigenschaften für beide Schädlinge verbessern würde.

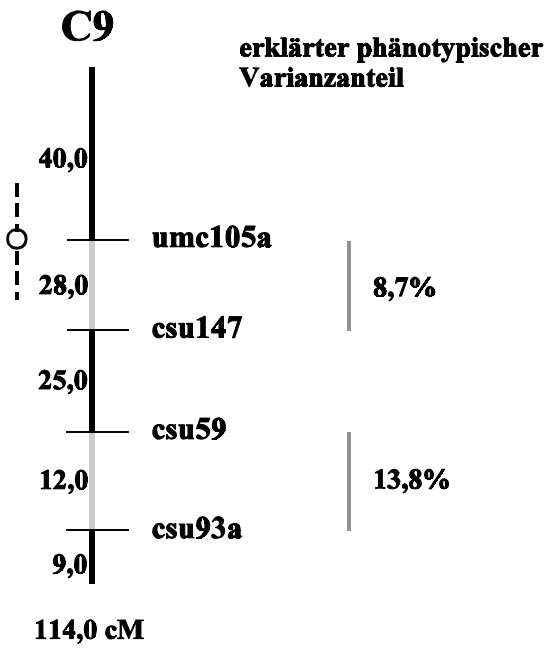


Abbildung 1: **QTL für Resistenz gegen *Diatraea saccharalis* F. auf Maischromosom 9.** Angabe der genetischen Distanz [cM], sowie des hierdurch erklärten phänotypischen Varianzanteil [%]. Nach Bohn, *et al*. (1996)

Ein Vergleich zwischen den QTL-Kartierungsexperimenten zeigte, daß auf Chromosom 9 QTL lokalisiert sind, die einen großen Effekt auf die Resistenz haben (Abbildung 1). Der Abstand der flankierenden Marker dieser QTL variierte zwischen 6,6 und 28 cM. Der erklärte phänotypische Varianzanteil der QTL-Regionen auf Chromosom 9 an der Resistenz gegen SWCB und SCB (Bonitur der Blattfraßresistenz) lag im Bereich zwischen 5,6 und 25% bei der Kreuzung Ki3 × CML139, bzw. 8,1 und 30,8% bei der Kreuzung CML131 × CML67 (BOHN *et al.* 1996, 1997 b). Aufgrund der großen Effekte auf das Resistenzniveau läßt dies die Vermutung zu, daß es sich hier eventuell um Hauptgene handeln könnte.

Eine Erhöhung der Markerdichte durch Hinzufügen polymorpher Marker im Bereich kartierter QTL für Zünslerresistenz wäre in mehrerlei Hinsicht vorteilhaft. Bei zukünftigen genetischen Kartierungen können zusätzliche molekulare Sonden zu einer Verminderung des teilweise noch großen Abstandes flankierender molekularer Marker beitragen. Dies ist für eine effizientere MAS, insbesondere im Hinblick auf eine Reduktion der Übertragung unerwünschter flankierender Genombereiche (*´linkage drag´* -STAM UND ZEVEN, 1981), aber auch zur Verminderung der Wahrscheinlichkeit doppelter Rekombinationen zwischen weit auseinanderliegenden flankierenden Markerorten wichtig. ALPERT UND TANKSLEY (1996) haben gezeigt, daß eine Isolierung von einzelnen QTL bei Tomate durch *´map based cloning´* (ORKIN, 1986; GOODFELLOW, 1986 und 1987) möglich ist. Hierfür ist jedoch eine sehr enge physikalische Kopplung flankierender molekularer Marker mit dem quantitativen Zielgen erforderlich (LEYSER UND CHANG, 1996). Für eine mögliche Isolierung von Genen für Zünslerresistenz bei Mais, zur Übertragung in anfälliges Zuchtmaterial mit biotechnologischen Ansätzen, kann eine hohe Markerdichte im Bereich der bereits kartierten QTL auf Chromosom 9 einen Beitrag leisten.

In zahlreichen Arbeiten wurde gezeigt, daß das Verhältnis zwischen genetischer und physikalischer Distanz von molekularen Markern in Abhängigkeit des Organismus und der Chromosomenregion sehr unterschiedlich sein kann (DVORAK *et al.*, 1984; SEARS, 1984; SNAPE *et al.*, 1985; DVORAK UND APELS, 1986; CURTIS UND LUKASZEWSKI, 1991; BROWN UND SUNDARESAN, 1991; LUKASZEWSKI UND CURTIS, 1993; HOHMANN *et al.*, 1994; CIVARDI *et al.*, 1994). Es ist deshalb nicht möglich, aufgrund genetischer Kartierungsdaten Aufschluß über die physikalische Anordnung und Ausdehnung betreffender Genomregionen zu erhalten. Hierzu wäre eine physikalische Kartierung der molekularen Marker notwendig.

Mit Hilfe der Chromosomenmikrodissektion besteht eine Möglichkeit zur gezielten Entwicklung molekularer Marker aus einem bestimmten Genombereich (KAO, 1993 und 1996; CANNIZZARO, 1996). Die von SCALENGHE *et al*., (1981) entwickelte Technik basiert auf der Isolierung von DNA aus mikroskopischen Chromosomenpräparaten. Bisher wurde die Chromosomenmikrodissektion bei zahlreichen Klonierungs- und Kartierungsansätzen im Human-, Tier- und Pflanzenbereich angewandt (Genomkartierung: NEWSHAM *et al.*, 1991; SCHONDELMAIER *et al.*, 1993; Genisolierung: PIROTTA *et al.*, 1983; HAENLIN *et al.*, 1985; MELTZER *et al.*, 1997; Genomanalyse: MELTZER *et al.*, 1992; Physikalische Kartierung: DAVIES *et al.*, 1990; SPIELVOGEL *et al*., 1992; BARNAS *et al.*, 1995). Gegenüber anderen Techniken zur Erzeugung segmentspezifischer DNA-Sonden, wie z.B. *´chromosome sorting´* (DAVIES *et al.*, 1981; WANG *et al.*, 1992) oder *´random cloning´* mit monosomen Additionslinien (GUSELLA *et al.*, 1980; ANANIEV *et al.*, 1997), besteht die Möglichkeit der Entwicklung chromosomenspezifischer DNA-Sonden aus einem räumlich begrenzten Bereiche des Genoms. Die mögliche Auflösung wird hierbei durch das verwendete Ausgangsmaterial bestimmt. Eine wichtige Voraussetzung ist die Identifizierbarkeit der Zielregion im mikroskopischen Präparat.

In den Arbeiten von STEIN *et al.* (1998) und STEIN (1998) wurden wesentliche Grundlagen für einen Einsatz der Chromosomenmikrodissektion zur Erstellung segmentspezifischer DNA-Bibliotheken bei Mais geschaffen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit kam die Chromosomenmikrodissektion mit dem Ziel zum Einsatz, neue molekulare Marker aus dem Bereich kartierter QTL für Zünslerresistenz auf Chromosom 9 zu erstellen. Diese sollen eine engere genetische Eingrenzung der entsprechenden Genomregion für eine effizientere MAS in der Resistenzzüchtung ermöglichen. Des weiteren sollte durch eine physikalische Kartierung molekularer Marker **i)** eine Darstellung der physikalischen Ausdehnung der QTL-Region, **ii)** eine Korrelation zwischen genetischer und physikalischer Distanz zwischen molekularen Markern erfolgen. Diese Daten könnten für eine zukünftigen Isolierung von Resistenzgenen aus diesem Bereich wichtige Referenzpunkte liefern.

2. Material

2.1. Pflanzenmaterial

Genotyp	Herkunft	Referenz
Ac7729	CIMMYT, Mexico	
BMSC	D.F. Weber, Illinois State University, Normal, Illinois, USA	
CML67	CIMMYT, Mexico	CIMMYT Maize Program, 1991
CML131	CIMMYT, Mexico	CIMMYT, Maize Program, 1991
CML139	CIMMYT, Mexico	CIMMYT Maize Program, 1991
CML247	CIMMYT, Mexico	CIMMYT Maize Program, 1994
Ki3	CIMMYT, Mexico	CIMMYT, Maize Program, 1991
KYS	D.F. Weber, Illinois State University, Normal, Illinois, USA	LEVINGS UND STUBER, 1971
TB-9Sb	D.F. Weber, Illinois State University, Normal, Illinois, USA	ROMAN, 1948
TB-9Lc	D.F. Weber, Illinois State University, Normal, Illinois, USA	BECKETT, 1978

2.2. Bakterienstämme

Stamm	Hersteller
Escherichia Coli MaxEfficiency™ DH5α	Life Technologies, Eggenstein
Epiqurian Coli® XL2-Blue Ultracompetent Cells	Stratagene, Heidelberg

2.3. Chemikalien

Chemikalie	Hersteller / Bezugsquelle
Agarose, SeaKem® LE	Biozym, Hameln
Ampicillin	Biomol, Hamburg
Anti-Avidin D-Antikörper (aus Ziege), biotinyliert	Vector Laboratories, USA
Anti-Digoxygenin-AP, Fab-Fragmente Anti-Digoxygenin-Rhodamin	Boehringer, Mannheim
Bacto Agar	Difco, USA
Bacto Trypton	Difco, USA
BCIP	Life Technologies, Eggenstein
Blocking reagent	Boehringer, Mannheim
BSA (98-99 %)	Sigma, Steinheim
CSPD®	Tropix Inc., USA
CTAB	Sigma, Steinheim
Dichlordimethylsilan	Merck, Darmstadt
FITC-Avidinkonjugat	Vector Laboratories, USA
Formamid (99 %, p.a.)	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Merck, Darmstadt
IPTG	Biomol, Hamburg
Kanamycin	Sigma, Steinheim
NBT	Life Technologies, Eggenstein
Paraffin, flüssig	Merck, Darmstadt
Phenol (Puffer gesättigt, pH 7,4)	Life Technologies, Eggenstein
Streptavidin AP	Life Technologies, Eggenstein
Vectashield mounting medium	Vector Laboratories, USA
X-Gal	Biomol, Hamburg

Alle weiteren organischen und anorganischen Chemikalien wurden jeweils in p.a. Qualität von den Firmen Merck, Roth, Serva und Sigma bezogen.

Es wurde grundsätzlich zweimal destilliertes Wasser verwendet.

2.4. Nukleinsäuren

Nukleinsäuren, allgemein		**Hersteller / Bezugsquelle**
DNA aus Heringsperma		Boehringer, Mannheim
DNA-Längenstandard:	MarkerIII	Boehringer, Mannheim
	DIG-MarkerIII	
	1 kb-ladder	Life Technologies, Eggenstein
pBluescript II SK+		Stratagene, Heidelberg
tRNA aus Bäckerhefe		Boehringer, Mannheim

Nukleotide	
$\alpha[^{32}P]$-dCTP	ICN Biochemicals GmbH, Eschwege
Biotin-14-dATP	Life Technologies, Eggenstein
dATP, dTTP, dCTP, dGTP	Pharmacia, Freiburg
DIG-11-dUTP, alkalilabil, alkalistabil	Boehringer, Mannheim

Oligonukleotide	**Sequenz**
6-MW	5'- CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G - 3'
Mbo20	5'- GGA TTT GCT GGT GCA GTA CA - 3'
Mbo24	5'- GAT CTG TAC TGC ACC AGC AAA TCC - 3'
Reverse sequencing primer (rsp16)	5'- AAC AGC TAT GAC CAT G - 3'
Sequencing primer (sp17)	5'- GTA AAA CGA CGG CCA GT - 3'

Oligonukleotide wurden bei der Firma Roth, Karlsruhe, sowie bei der Firma Interactiva, Ulm bezogen.

DNA-Sonden	**Bezugsquelle**
Cosmidbibliothek von Mais	J. Messing, V. Llaca
CentC (maiszentromerspezifische Sonde)	R.L. Phillips, University of Minnesota, St. Paul, USA;

2.5. Enzyme

DNA / RNA-modifizierende Enzyme	**Hersteller / Bezugsquelle**
Dnase I	Serva, Heidelberg
MboI	Life Technologies, Eggenstein
Nuclease S1	Boehringer, Mannheim
RNase A	Serva, Heidelberg
T4-Ligase	Life Technologies, Eggenstein
T4-Polynukleotid-Kinase (PNK)	New England Biolabs, Schwalbach
Taq-Polymerase	Pharmacia, Freiburg
Tth-Polymerase	Pharmacia, Freiburg
weitere Restriktionsendonukleasen	Boehringer, Mannheim Life Technologies, Eggenstein New England Biolabs, Schwalbach Pharmacia, Freiburg

Andere Enzyme	**Hersteller / Bezugsquelle**
Alkalische Phosphatase	Boehringer, Mannheim
Cellulase (Onozuka R10)	Kinki Yakult, Japan
Pectinase (Macerozyme)	Kinki Yakult, Japan
Pectolyase	Sigma, Steinheim ICH Biochemicals GmbH, Eschwege
Proteinase K, Lösung	Boehringer, Mannheim
Proteinase K, DNA grade	Merck, Darmstadt

2.6. Reaktionssysteme, gebrauchsfertig

Reaktionssystem	**Hersteller / Bezugsquelle**
Nick-Translationssystem	Life Technologies, Eggenstein
Plasmidpräparationskit Mini, Midi, Maxi	Qiagen, Hilden
Qiaex, Gelextraktionskit	Qiagen, Hilden

2.7. Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller / Bezugsquelle
Dialyseschlauch (Servapor 44145, Flachbreite 16 mm)	Serva, Heidelberg
Glasstäbe, Sodaglas	Bender & Hobein, Tübingen
MicroSpin™ Säule (S-300 HR)	Pharmacia, Freiburg
Mikrodialysemembran (VSWPO2500; Porengröße 0,025 µm)	Millipore, Eschborn
Nylonmembran (Proablot NYamp, 82 + 132 mm)	Macherey-Nagel, Düren
Nylonmembran (Hybond™ N, neutral)	Amersham Life Science, Braunschweig
Nylonmembran (Duralon-UV™, 82 + 137 mm)	Stratagene, Heidelberg
Pipettenspitzen mit Aerosolschutz	Greiner, Göppingen Biozym, Hameln Roth, Karlsruhe

Alle übrigen Plastikwaren wurden von den Firmen Eppendorf, Greiner und Roth bezogen.

2.8. Geräte

Neben den Standardausrüstungen eines molekularbiologischen Labors wurden zusätzlich folgende Geräte verwendet:

Gerät	Hersteller / Bezugsquelle
Blotter, Minifold I SRC-96	Schleicher&Schuell, Dassel
Filterkombinationen für FITC- und PI-Epifluoreszenz (Fluoreszenz-Sperrfilter FITC-45, Langpaßemissionsfilter LP 520)	Schott, Mainz
Gewächshausbeleuchtung: OKAY 1000 R7s-15, SON-T AGRO 400 HPI-T 400 W	Philips
Kugelmühle (mahlen von Blattmaterial)	Retsch
Lampe für UV-Mikroskopie: HBO50	Osram, Berlin

Gerät	Hersteller / Bezugsquelle
Mikrodissektionsapparatur: inverses Mikroskop (AXIOVERT, Zeiss) Mikromanipulator 5171 (Eppendorf)	S+L Mikrotest, Jena
N2-Laser (VSL-337ND)	Laser Science, USA
Mikroschmiede (DeFonbrune)	Bachofer, Reutlingen
Pressure Blotter mit Pressure Control Station	Stratagene, Heidelberg
Sterile Werkbank (*Lamin Air*® HV-mini)	Heraeus, Stuttgart
Stratalinker 2400	Stratagene, Heidelberg
Thermocycler (Gene ATAQ Controller)	Pharmacia, Freiburg
Thermostat (2219 Multitemp II)	LKB, Bromma, Schweden
UV-Kammer (λ=260 nm, 6 x 15 W)	MPI Zellbiologie, Heidelberg
UV-Transilluminatoren: Chroma 41 (λ=254 nm) RU-VE Chroma 42 (λ=366 nm)	Vetter GmbH, Wiesloch
Videodokumentationsanlage	S+L Mikrotest, Jena

2.9. Fotomaterial

Fotomaterial	Hersteller
Kleinbildfilm (FP4, HP5; s/w-Negativ)	Ilford, Neu-Isenburg
Farbnegativfilme, Kodakcolor 400	Kodak, Stuttgart
Farbpositivfilme, Kodak Elitechrom 100 (Tageslicht), 400	Kodak, Stuttgart
Negativentwickler (Microphen)	Ilford, Neu-Isenburg
Positiventwickler (Neutol liquid NE)	Agfa, Leverkusen
Fixierbad (Acidofix)	Agfa, Leverkusen
Fotopapier (BROVIRA-SPEED, Körnung 3, 4, 5)	Agfa, Leverkusen
Videoprinterpapier (UPP-110HD)	Sony Corp., Tokyo, Japan
X-Ray Filme	Fuji, Tokyo, Japan

3. Methoden

3.1. Pflanzenanzucht

Zur Anzucht von Spenderpflanzen für die Präparation von Pachytänchromosomen aus Pollenmutterzellen (PMZ) wurde das Saatgut im Gewächshaus in Erde ausgekeimt (Erde im Verhältnis 2 + 1 mit Einheitserde vermischt, Plastiktöpfe 9 × 9 cm). Während des Auflaufens standen die Keimlinge unter Lampen mit einer Lichtleistung von 20 kLux, die aufgrund ihres Lichtspektrum zusätzlich Wärme abgaben (Mindesttagestemperatur: 30°C; Tag / Nacht: 16 Stunden / 8 Stunden). Bei einer Wuchshöhe von 10 cm (nach 10 bis 14 Tagen) wurden die Pflanzen unter Quecksilberdampflampen (Philips) mit einer Lichtleistung von 34 kLux gestellt (Mindesttagestemperatur: 20°C; Tag / Nacht: 16 Stunden / 8 Stunden). Im Vier- bis Fünfblattstadium erfolgte das erste Umtopfen in 13 × 13 cm Plastiktöpfe und sechs bis sieben Wochen nach Aussaat in 8 l Kunststoffcontainer (Beleuchtung 10 bis 16 kLux; Tag / Nacht: 16 Stunden / 8 Stunden). Um eine ausreichende Nährstoffversorgung der Pflanzen sicherzustellen, erfolgte ab der dritten Woche nach Aussaat eine wöchentliche Düngergabe mit einer 2%igen Düngerlösung (Handelsname WUXAL: N+P+K+ Spurenelemente, Aglukon, Düsseldorf). Handelsübliche Insektizide wurden je nach Schädlingsbefall eingesetzt.

Zur Präparation mitotischer Metaphasechromosomen dienten Wurzelmeristeme. Hierzu wurden Maiskörner in Keimpapier eingerollt und, in einer Feuchtekammer stehend, in einem Inkubator (28°C, kein Licht) ausgekeimt. Bei einer Länge von etwa 2 bis 3 cm wurden die Wurzeln abgeschnitten und fixiert (Kapitel 3.2.2.) (je nach Genotyp nach drei bis vier Tagen). Um von den Keimlingen zu einem späteren Zeitpunkt neu gebildete Wurzeln abschneiden zu können, wurden sie in Erde getopft und im Gewächshaus weiter angezogen.

3.2. Fixierung von Ausgangsmaterial zur Chromosomenpräparation

3.2.1. Antherenfixierung

Es besteht eine Korrelation zwischen Antherenlänge und Entwicklungsstadium der PMZ innerhalb der Meiose. Diese ist genotypabhängig. Mit Hilfe des Binokulars wurde eine Anthere einer Blüte nach Quetschung in Karminessigsäure [2% Karmin in 45% Essigsäure] untersucht. Befanden sich die PMZ im Pachytänstadium, wurden die verbliebenen beiden Antheren der Blüte in 70% Ethanol fixiert (4°C, über Nacht, danach bei -20°C) oder direkt zur Herstellung von Chromosomenpräparaten für die Mikrodissektion verwendet.

3.2.2. Wurzelfixierung

Die Fixierung der Wurzeln und die spätere Präparation der Chromosomen folgte im wesentlichen den Arbeiten von PAN *et al.* (1993), sowie JEWELL UND ISLAM-FARIDI (1994). Zur Inhibierung des Mitosespindelapparates wurden die Wurzeln in einer wässrigen Lösung aus 0,04% 8-Hydroxychinolin (w/v) und 0,03% DMSO (v/v) bei Raumtemperatur (20-25°C; 4-5 Stunden) inkubiert. Danach wurden sie dreimal mit jeweils ca. 15 ml Wasser gespült und vor der anschließenden Fixierung mit Hilfe von saugfähigem Papier von Wassertropfen befreit. Dienten die Wurzeln als Ausgangsmaterial von Chromosomenpräparaten für die Mikrodissektion, wurden sie in 70% Ethanol fixiert. Zur Präparation von Chromosomen für die *in situ* Hybridisierung erfolgte eine Fixierung in Carnoy-Lösung-I [Ethanol / Eisessig: 3+1] (SINGH, 1993). Die fixierten Wurzeln wurden bei 4°C über Nacht inkubiert, danach bis zur Präparation bei -20°C gelagert.

3.3. Präparation von Chromosomen

3.3.1. Pachytänchromosomen

Als Ausgangsmaterial für die Mikrodissektion dienten ungefärbte Pachytänchromosomen der Inzuchtlinien KYS und CML139. Die Präparation der Chromosomen erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von SHEN UND WU (1989) und wurde wie bei HENRICH *et al.* (1997) beschrieben durchgeführt. Vor der Präparation wurden die Antheren zweimal in Wasser gewaschen und für mindestens eine Stunde im Wasser auf Eis belassen. Die Antheren wurden

auf einem ethanolgereinigten Deckglas (24 × 40 mm) mit einem Skalpell an einem Ende geöffnet und die PMZ mittels Präpariernadel in einen 10 µl Tropfen Essigsäure [45%] ausgequetscht. Die Zellen wurden rasch mit einem Deckglas (22 × 22 mm) fixiert und die Chromosomen durch leichtes Tippen auf das Deckglas aus den Zellen gelöst. Nach spätestens 30 bis 60 Sekunden wurde das Präparat auf Trockeneis ausgefroren, nach Entfernung des Deckglases in Carnoy-Lösung-I aufgetaut (10 Sekunden), in Ethanol (absolut) entwässert (30 Sekunden) und anschließend luftgetrocknet. Die Präparate wurden bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert.

3.3.2. Mitotische Metaphasechromosomen

Für die Mikrodissektion wurden ungefärbte mitotische Metaphasechromosomen der *B-A* Translokationslinie TB-9Lc verwendet. Für die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung wurden zusätzlich Chromosomen der Linie KYS, der *B-A* Translokation TB-9Lb, sowie einer B-Chromosomen haltigen BMSC-Linie präpariert. Die als Ausgangsmaterial für die Mikrodissektion verwendete Linie TB-9Lc ist durch eine Translokation zwischen dem langen Arm von Chromosom 9 und dem Arm eines B-Chromosoms charakterisiert (Abbildung 2). Somit ist fast der gesamte lange Arm von Chromosom 9 durch das telozentrische *B-9* Chromosom repräsentiert. Da der A-Chromosomensatz im Maisgenom aus metazentrischen und akrozentrischen Chromosomen besteht, wird somit eine Identifikation der Translokationschromosomen möglich. Gleiches gilt für die *B-A* Translokation TB-9Sb, mit dem Unterschied, daß durch Translokation im kurzen Arm von Chromosom 9 die telozentrischen *B-9* Chromosomen den entsprechend kurzen Chromosomenarm repräsentieren. Aufgrund einer ungleichmäßigen Verteilung der *B-A* Translokationschromosomen während der zweiten meiotischen Teilung der Pollenmutterzellen (*´nondisjunction´* - D. WEBER, pers. Mitt.), enthält ein Teil der Kreuzungsnachkommenschaften von TB-9Lc 22 Chromosomen im diploiden Chromosomensatz (u.a. 1 × 9, 1 × *9-B*, 2 × *B-9*). Aufgrund eines zusätzlichen B-Chromosoms im Genom der Translokation TB-9Sb zeigt diese insgesamt 23 Chromosomen (D. WEBER, pers. Mitt.).

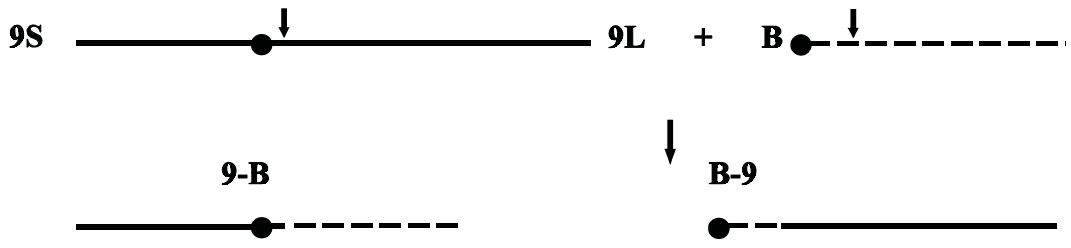


Abbildung 2: ***B-A* Translokation der Linie TB-9Lc**

Zwischen den jeweils zentromernahen Austauschpunkten (Pfeil) bei Chromosom 9 und B kommt es zur Translokation. Hieraus resultieren zwei verschiedene Translokationschromosomen:

9-B mit dem kurzen Arm und dem Zentromer von Chromosom 9, sowie eines sehr kurzen Bereiches von 9L, gefolgt von einem Segment des B-Chromosomenarmes

B-9 mit dem B-Zentromer, einem Teil des B-Chromosomenarmes, sowie fast dem gesamten langen Arm von Chromosom 9

Die Präparation der Chromosomen erfolgte nach modifizierten Methoden von PAN *et al.* (1993), sowie JEWELL UND ISLAM-FARIDI (1994). Die in 70% Ethanol, bzw. Carnoy-Lösung-I fixierten Wurzeln wurden gewaschen (Wasser: 1 × kurz, 1 × 15 Minuten; KE-Puffer [75 mM KCl; 7,5 mM EDTA; pH 7,4]: 1 × kurz, 1 × 15 Minuten - jeweils auf Eis). Die Meristeme der Wurzeln (die vorderen 1 bis 2 mm) wurden mit Hilfe eines Skalpells abgetrennt und enzymatisch mazeriert [2,5 % Pectolyase Y-23; 2,5 % Cellulase (Onozuka R-10); 75 mM KCl; 7,5 mM EDTA; pH 4,0] (37°C; 20 bis 55 Minuten - je nach verwendetem Fixans; 12 bis15 Meristeme in 125 µl Enzymlösung). Anschließend wurde die Enzymlösung entfernt und die Meristeme mindestens dreimal vorsichtig mit Wasser gewaschen. In Abhängigkeit der weiteren Verwendung wurde unmittelbar danach mit Hilfe einer Pasteurpipette jeweils ein Meristem entweder auf ein 24 × 40 mm Deckglas (für Mikrodissektionen) oder auf einen Objektträger (jeweils ethanolgereinigt und abgeflammt) transferiert. Mit einer feinen Pinzette wurden die Meristeme in 10 bis 50 µl kalter Carnoy-Lösung-I zu einer Zellsuspension mazeriert und auf dem Deckglas, bzw. Objektträger verteilt. Vor dem vollständigen Verdunsten wurde weitere Carnoy-Lösung-I aufgetropft und das Präparat anschließend luftgetrocknet. Die Präparate wurden bis zum Gebrauch bei -20 °C (für die Mikrodissektion), oder staubfrei bei Raumtemperatur (für die *in situ* Hybridisierung) gelagert. Mitotische und

meiotische Chromosomenpräparate wurden mit Hilfe eines Inversmikroskops nach geeigneten Chromosomen abgesucht und deren Positionen mittels elektronischer Tischsteuerung gespeichert.

3.4. Mikrodissektion

3.4.1. Vorbereitung von Glasnadeln und Objektträgern

Zur Mikrodissektion von Chromosomen wurden Glasnadeln verwendet. Hierzu wurden Glasstäbe (Sodaglas, ⌀ 5 mm) über einer Flamme angeschmolzen und fein ausgezogen (⌀ ca. 1 mm). Der ausgezogene Bereich wurde auf etwa 10 cm verkürzt und das stumpfe Ende an einer Mikroschmiede zugespitzt. Der vordere Bereich der Glasnadeln (etwa 2 bis 3 cm), sowie die zum Sammeln dissektierter Chromosomensegmente verwendeten Deckgläser (24 × 40 mm) wurden entfettet (0,25 N HCl, 1 Minute), silikonisiert (Dichlormethylsilan, 1 Minute), kurz mit Ethanol (absolut) und anschließend mit Wasser gespült. Die Deckgläser wurden bis zum Gebrauch staubfrei gelagert. Die Glasnadeln wurden mit UV-Licht bestrahlt (λ = 260 nm, 6 × 15 W, 30 Minuten) und in einer Werkbank steril gelagert.

3.4.2. Isolierung von Chromosomensegmenten

Auf ein silikonisiertes Deckglas (24 × 40 mm) wurden mehrere Mikrotropfen (ca. 100 nl) GP-Puffer [50% Glycerin (v/v); 25 mM Na_2HPO_4; sterilfiltriert, 30 Minuten UV-bestrahlt] pipettiert. Das Deckglas wurde in einer verschlossenen Feuchtekammer UV-bestrahlt (λ = 260 nm, 6 × 15 W, 30 Minuten). Das Chromosomenpräparat und das Deckglas mit den Sammeltropfen wurden auf dem Mikroskoptisch der Mikrodissektionsanlage positioniert. Mittels einer in einen Mikromanipulator eingespannten Glasnadel wurden Chromosomens-egmente isoliert. Mehrere Segmente wurden in einem Sammeltropfen auf dem benachbarten Deckglas mit der Glasnadel abgelegt. Um einer möglichen Kontamination mit Segmenten aus anderen Chromosomenbereichen vorzubeugen, wurde vor Dissektion der gewünschten Segmente das übrige Chromatin aus dem benachbarten Bereich im Präparat mit Hilfe eines gepulsten Stickstofflasers entfernt.

3.5. Mikroamplifikation dissektierter Chromosomensegmente

Zur Mikroamplifikation der dissektierten Chromosomensegmente sind mehrere biochemische Arbeitsschritte notwendig. Verschiedene Positiv- und Negativkontrollen sind notwendig, um die einzelnen Reaktionsschritte zu kontrollieren. Um die bei STEIN *et al.* (1998) beschriebene DNA-Amplifikation der Negativkontrolle (keine Mais-DNA in die Reaktion eingesetzt) zu qualifizieren und zu minimieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei verschiedene PCR-Ansätze zur Amplifikation dissektierten Chromatins verfolgt.

3.5.1. Mikroamplifikation mittels Linkeradapter-PCR (LA-PCR)

Eine ausführliche Beschreibung dieser Methode findet sich in PONELIES *et al.* (1997), sowie STEIN *et al.* (1998) und STEIN (1998).

3.5.1.1. Proteinase K-Behandlung

Nach Isolierung der Chromosomensegmente wurden die Sammeltropfen mit jeweils 5 µl Proteinase K Lösung überschichtet [2 mg × ml^{-1} Proteinase K (Boehringer oder Merck); 0,25% SDS; 10mM Tris-HCl (pH 7,5); 1 mM EDTA], bei 37°C (1,5 bis 3 Stunden) in einer Feuchtekammer inkubiert und anschließend die Reaktionsvolumen in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Als Negativkontrolle I diente ein Sammeltropfen ohne Chromosomensegmente. Zur Enzymdeaktivierung wurde eine dreimalige Extraktion mit je 1 Volumen Phenol / Chloroform (1 + 1; TE-gesättigt) durchgeführt, gefolgt von einer Mikrodialyse (Mikrodialysemembran; 45 Minuten) gegen 25 ml TE-Puffer (pH 8,0) [10 mM Tris-HCl (pH 8,0); 1 mM EDTA].

3.5.1.2. Restriktionsverdau und Linkeradapter-Ligation

Nach der Mikrodialyse wurde das Volumen vollständig in einen Verdau mit der Restriktionsendonuklease *MboI* (10 U, 37°C, 1 bis 1,5 Stunden - nach PONELIES *et al.* (1997) und STEIN *et al.* (1998) - sowie 0,1 bis 10 U, 37°C, 17 Stunden) eingesetzt (Endvolumen: 10 µl). Weitere Restriktionsansätze dienten als Positiv- bzw. Negativkontrollen (Restriktionsverdaue mit 1,5 pg Mais-DNA Lösung als Positivkontrolle, bzw. ohne Zugabe von Mais-DNA Lösung als Negativkontrolle). Nach Deaktivierung der Restriktionsendonuklease durch Hitzebehandlung (65°C, 20 Minuten) wurde das gesamte Volumen zur Ligation der DNA-Fragmente

mit 4 pmol *Mbo*-Linkeradaptern (JOHNSON, 1990) eingesetzt (Endvolumen: 15 µl, 1 U T4-Ligase, 0,5 × Reaktionspuffer, 15°C, 12 bis 16 Stunden).

3.5.1.3. Linkeradapter-PCR (LA-PCR)

Das gesamte Volumen der Ligationsreaktion (15 µl) wurde in einen PCR-Ansatz überführt [Endvolumen: 100 µl; 1 × Reaktionspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 9,0, 50 mM KCl, 1,5 mM $MgCl_2$), 250 µM je dNTP, 50 pmol *Mbo*20-Primer, 2,5 U *Taq*-Polymerase] und mit 100 µl sterilisiertem Paraffinöl überschichtet. Die Amplifizierung erfolgte nach PCR Programm 1 (Tabelle 1). Nach Analyse von 20 µl des Amplifikationsproduktes in einer Agarosegelelektrophorese (1,5% Agarosegel, 1 × TAE) wurde das restliche LA-PCR-Produkt mit einem Volumen Phenol / Chloroform (1 + 1) und anschließend mit einem Volumen Chloroform extrahiert, gefolgt von einer Mikrodialyse (Mikrodialysemembran; 45 Minuten gegen 25 ml TE-Puffer, pH 8,0).

3.5.2. Mikroamplifikation mittels ´*degenerate-oligonucleotide-primed*-PCR´ (DOP-PCR, TELENIUS *et al.,* 1992)

Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit zur Bestimmung der Herkunft der DNA-Kontamination in der LA-PCR nach PONELIES *et al.* (1997), bzw. STEIN *et al.* (1998) wurde die DOP-PCR (TELENIUS *et al.,* 1992) als Möglichkeit zur quantitativen Amplifikation mikrodissektierten Chromatins untersucht. Um die Parameter hinsichtlich einer angestrebten Minimierung, bzw. Ausschaltung von DNA Amplifikationen in der Negativkontrolle zu bewerten, wurden verschiedene Ausgangskonzentrationen von Mais-DNA Lösung (1,5 pg; 150 fg; 15 fg; keine DNA) nach der Methode von TELENIUS *et al.* (1992) amplifiziert (Tabelle 1 - Programm 4). Mit einer Konzentration von 1,5 pg DNA-Lösung wurde zusätzlich die Zyklenzahl unter stringenten Reaktionsbedingungen (62°C ´*annealing*´) variiert (30, 35, 40, 45 Zyklen).

Tabelle 1: Reaktionsbedingungen der verwendeten PCR-Programme

Parameter	Programm 1 LA-PCR	Programm 2 Standard-PCR	Programm 3 Markierungs-PCR	Programm 4 DOP-PCR
Primer	0,50 µM[1)]	0,25 / 0,25 µM[2)]	0,50 µM[1) 3)]	2,00 µM[4)]
dNTP`s (jeweils)	0,25 mM	0,25 mM	0,10 mM[5) 6)]	0,20 mM
Biotin-14-dATP	----------	----------	0,04 mM[7)]	----------
DIG-dUTP	----------	----------	0,01 mM[8)]	----------
Mg^{2+} [6)]	3,25 mM[9)]	1,50 mM	1,50 mM	2,00 mM
Polymerase	2,50 U (*Taq*)	1,00 U (*Taq* / *Tth*)	1,00 U (*Taq* / *Tth*)	1,25 U / 50 µl
Programm	95°C, 4,0 Minuten 40 Zyklen: [94°C; 1,0 Minute 45°C; 1,5 Minuten 72°C; 2,0 Minuten] 72°C; 5,0 Minuten	94°C, 1,0 Minute 35 Zyklen: [94°C; 1,0 Minute 55°C; 2,0 Minuten 72°C; 2,0 Minuten] 72°C; 6,0 Minuten	95°C, 4,0 Minuten 35 Zyklen: [94°C; 1,0 Minuten 50°C; 1,0 Minuten 72°C; 2,0 Minuten] 72°C; 5,0 Minuten	94°C; 4,0 Minuten 5 Zyklen: [94°C; 1,0 Minute 30°C; 3,0 Minuten 72°C; 3,0 Minuten (4 s /°C)] 25 Zyklen[10)]: [94°C; 1,0 Minute 62°C; 1,0 Minute 72°C; 2,0 Minuten] 72°C; 10,0 Minuten

1) Mbo20-primer; 2) *´sequencing´/´reverse sequencing primer´*; 3) Bei Markierung von Insertsequenzen jeweils 0,25 µM *´sequencing´* und *´reverse sequencing primer´*; 4) 6-MW-primer; 5) Bei Biotinmarkierung nur 0,06 mM dATP; 6) Bei DIG-Markierung nur 0,09 mM dTTP; 7) Zur Biotinmarkierung; 8) Zur DIG-Markierung; 9) Die Konzentration an Mg^{2+} setzt sich aus der akkumulierten Menge aus Restriktionsverdau, Ligationsreaktion und PCR zusammen; 10) Variation der Zyklenzahl (30/35/40/45)

3.5.3. Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationen bei der PCR-Amplifikation

Zur Vermeidung von Kontaminationen in der PCR wurden alle damit verbundenen Reaktionsansätze und Komponenten ausschließlich in einer, nur für diesen Zweck genutzten, sterilen Werkbank pipettiert. Diese stand in einem, von allen übrigen DNA-Analysearbeiten, räumlich getrennten Labor. Die verwendeten Pipettierhilfen kamen nur innerhalb dieser Werkbank zum Einsatz. Als weitere Maßnahme wurden nur Sicherheitspipettenspitzen (mit Aerosolschutz) verwendet. Alle Reaktionskomponenten wurden in geeigneten Volumina aliquotiert und für 30 Minuten mit UV-Licht bestrahlt (λ=260 nm, 6 × 15 W). Aliquots wurden nur zum Ansetzen einer Reaktion verwendet - mögliche Reste wurden verworfen.

3.6. Standardtechniken

3.6.1. Restriktionsverdau

Restriktionsverdaue von Plasmid- oder genomischer DNA wurden, wenn nicht anders angegeben, gemäß Herstellerangaben der verwendeten Restriktionsendonukleasen durchgeführt.

3.6.2. Agarosegelelektrophorese (SAMBROOK *et al.,* 1989)

DNA wurde mittels Agarosegelelektrophorese analysiert (10 Volt × cm^{-1}; 0,8 bis 3,0% Agarosegel; 1 × TAE oder 1 × TBE) [50 × TAE-Puffer: 2 M Tris; 5,7% (v/v) Essigsäure; 50 mM EDTA; 5 × TBE-Puffer: 0,45 M Tris; 0,6 M Borsäure, 10 mM EDTA]. Die Gele wurden nach der Elektrophorese in einem Ethidiumbromidbad [5 µg × ml^{-1}] 5 bis 10 Minuten gefärbt, 10 bis 15 Minuten in Wasser entfärbt und anschließend unter Anregung mit UV-Licht dokumentiert (λ= 254 nm, bzw. λ = 366 nm für präparative Gele).

3.6.3. DNA-Transfer nach SOUTHERN (1975)

In Agarosegelen aufgetrennte DNA wurde denaturiert [1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH] (2 × 15 Minuten), neutralisiert [1,5 M NaCl; 0,5 M Tris-HCl (pH 7,5)] (1 × 30 Minuten) und anschließend durch Kapillartransfer oder mittels Druckluft in einem *´pressure blotter´* (4 Stunden, 85 mm Hg) auf eine ungeladene Nylonmembran übertragen (Transferpuffer: [25 mM $NaPO_4$ (pH 6,5)] HOISINGTON *et al.,* 1994). Zur Entfernung von Agaroseresten

wurden die Filter anschließend unmittelbar in 2 × SSC gewaschen [20 × SSC: 3 M NaCl; 0,3 M tri-Natriumcitratdihydrat] (15 Minuten), bevor mittels UV-Licht (Stratalinker 2400, *´UV-crosslinking´*) die DNA kovalent an die Membran gebunden wurde. Zur Verminderung unspezifischer Hintergrundsignale bei nichtradioaktiven Hybridisierungen wurde zusätzlich die Filterrückseite mit UV-Licht bestrahlt (BOEHRINGER MANNHEIM, 1996).

3.6.4. Koloniefilter

Bakterienkolonien wurden auf ungeladene Nylonrundfilter ("proablot NYamp", oder "Duralon-UV™") durch Kolonielift übertragen und gemäß Herstellerangaben alkalisch lysiert. Nach kovalenter Bindung der DNA durch *´UV-crosslinking´* wurden Zellreste gemäß Herstellerprotokoll mit Proteinase K verdaut. Die Filter wurden luftgetrocknet in Folie eingeschweißt und bis zum Gebrauch bei 4°C aufbewahrt.

3.6.5. Dot-Blot Filter

Zur Analyse einer Cosmidbibliothek aus genomischer Mais-DNA (siehe auch Kapitel 3.11.1) wurden Dot-Blot Filter hergestellt. Die Cosmid-DNA jeder Subbibliothek wurde aus einer 1,5 ml Übernachtkultur isoliert (Kapitel 3.9.1) und alkalisch denaturiert [Endvolumen: 500 µl; 0,4 N NaOH; 3 M NaCl] (4°C, über Nacht). Mit Hilfe eines Vakuumblotters (Minifold I SRC-96) wurde die gesamte isolierte DNA jeder Subbibliothek in einem 8 × 12 Raster auf ungeladene Nylonmembranen übertragen. Die Filter wurden anschließend kurz in 2 × SSC geschwenkt, bevor die DNA mittels *´UV-crosslinking´* fixiert wurde. Die luftgetrockneten Filter wurden bis zum Gebrauch in Folie eingeschweißt und bei 4°C gelagert.

3.6.6. Markierung von DNA

3.6.6.1. Nicktranslation

DNA wurde mit Hilfe eines Nicktranslationssystems (Life Technologies) gemäß Herstellerangaben markiert. Abweichend hierzu wurde zum Einsatz der Sonden in der *in situ* Hybridisierung zusätzlich 10 bis 40 ng *DNase*I zum Reaktionsansatz gegeben, um eine durchschnittliche Fragmentgröße von 0,5 kb nach der Markierungsreaktion zu erreichen. Je nach Anwendung wurden pro 50 µl Reaktionsansatz folgende Nukleotide eingesetzt:

- 50 µCi α [^{32}P]-dCTP
- 40 mM Biotin-14-dATP
- 20 µM DIG-11-dUTP; alkalilabil, oder alkalistabil

Nicht eingebaute Radionukleotide wurden mittels Zentrifugationssäule (MicroSpin™ Columns) abgetrennt. Überschüssige nichtradioaktive Nukleotide wurden durch Ethanolfällung der Sonde entfernt.

3.6.6.2. PCR-Markierung

Die Markierung von Mikroamplifikationsprodukten erfolgte mittels PCR entsprechend dem PCR-Protokoll 3 in Tabelle 1.

3.6.7. DNA-DNA Hybridisierung, nichtradioaktiv

Die DNA-DNA Hybridisierungen wurden nichtradioaktiv auf Grundlage des *´CIMMYT-Laboratory Protocol´* (HOISINGTON *et al.*, 1994) durchgeführt. Nach Vorhybridisierung mit 10 ml Hybridisierungslösung [5 × SSC; 0,01% Laurylsarcosin; 0,02% SDS; 0,3% Blockierungsreagenz; pH 7,4] (65°C, 2 bis 3 Stunden) wurden die Filter mit der denaturierten Sonde hybridisiert (65°C, 12 bis 16 Stunden; in 8 bis 10 ml frischer, auf 65°C vorgewärmter Hybridisierungslösung) [Sondenkonzentration:150 ng Sonden-DNA (5% DIG-11-dUTP) pro 1 ml Hybridisierungslösung; bei genomischer DNA als Sonde: 10 bis 20 ng × ml^{-1}]. Die nachfolgenden Inkubationen erfolgten, wenn nicht anders angegeben, in einer Inkubationsschale mit jeweils 200 ml Lösung bei 20 bis 25°C auf einem Schüttler. Nach der Hybridisierung wurden die Filter in Waschpuffer [0,5 × SSC; 0,1% SDS] gewaschen (zweimal je 5 Minuten bei 20 bis 25°C , danach unter leichtem Schwenken für 15 Minuten bei 65°C), kurz in Puffer 1 [0,01 M Tris-HCl, pH 7,5; 0,15 M NaCl] und 30 Minuten in Puffer 2 [0,01 M Tris-HCl, pH 7,5; 0,15 M NaCl; 0,1% Blockierungsreagenz] inkubiert. Anschließend folgten Inkubationen in Antikörperlösung [0,05 U Anti-digoxigenin-AP Fab fragments × ml^{-1} Puffer 2] (75 bis 100 ml, 30 Minuten in einer Edelstahlschale), danach in Puffer 2 (zweimal 15 Minuten), Puffer 1 (zweimal 15 Minuten), Puffer 3 [0,01 M Tris-HCl, pH 9,5] (5 Minuten) und in Substratlösung [55 µM CSPD® in Puffer 3]. Die Exposition erfolgte entweder bei 37°C (1 bis 2 Stunden) oder bei Raumtemperatur (20 bis 25°C, 15 bis18 Stunden).

3.6.8. DNA-DNA-Hybridisierung, radioaktiv

Radioaktive DNA-DNA Hybridisierungen wurden nach CHURCH UND GILBERT (1984) durchgeführt. Nach einer Vorhybridisierung mit 10 ml Hybridisierungslösung [0,25 M Na_2HPO_4; 7% SDS; 1 mM EDTA] (65°C, 30 bis 60 Minuten) wurden die Filter mit der denaturierten Sonde hybridisiert (65°C, 12 bis 16 Stunden; in 5 bis 10 ml frischer, auf 65°C

vorgewärmter Hybridisierungslösung, so daß die Filter ausreichend benetzt wurden). Das Waschen der Filter erfolgte mit je 50 ml Waschlösung [20 mM Na_2HPO_4; 1% SDS; 1 mM EDTA] (20 bis 25°C, 1 Minute; 65°C, 3 × 30 Minuten).

3.6.9. Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Einzelne DNA-Fragmente wurden entweder mit Hilfe eines Reaktionssystems auf Glasmilchbasis (Qiaex Gelextraktionskit, nach Herstellerangaben), oder mittels Zentrifugation durch Blottingpapier (WEICHENHAN, 1991) aus Agarosegelen extrahiert. Die Aufreinigung von LA-PCR-Produkten zur Klonierung erfolgte mittels Elektroelution. Zuvor wurden mit der Restriktionsendonuklease *MboI* die Adaptermoleküle von den amplifizierten Sequenzen getrennt (30 µl LA-PCR-Produkt; 10 U *MboI*; Endvolumen 35 µl). Nach anschließender Agarosegelelektrophorese (1,5 % Agarosegel, 1 × TBE) wurden die LA-PCR-Produkte aus dem Gel extrahiert und durch Elektroelution im Dialyseschlauch zurückgewonnen. Hierzu wurde das Gelstück mit 400 µl Elektrophoresepuffer (1 × TBE) in einem Dialyseschlauch eluiert (10 Volt × cm^{-1}, 30 Minuten). Durch kurzes Umpolen der angelegten Spannung (15 Sekunden) konnten eventuell an der Schlauchinnenseite haftende DNA-Moleküle abgelöst werden. Nach kurzem, vorsichtigem Reiben des Schlauches zwischen den Fingern wurde der Elektrophoresepuffer vollständig in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde gefällt (0,3 M Na-Acetat, 2,5 Volumen Ethanol, absolut, -80°C, über Nacht) und in 10 µl TE-Puffer (pH 8,0) resuspendiert. Durch optische Abschätzung im Agarosegel wurde die Konzentration der Ethidiumbromid gefärbten DNA bestimmt.

3.7. Klonierung von LA-PCR-Produkten

3.7.1. Linearisierung und Dephosphorylierung von Plasmidvektoren

Die zur Klonierung verwendeten Plasmidvektoren (pUC 18, bzw. pBluescriptSK +) wurden durch Restriktionsverdau mit *BamHI* linearisiert (Endvolumen: 35 µl; 10 µg Vektor-DNA; 1 U × μl^{-1} *BamHI*). Die Restriktionsendonuklease wurde durch Phenolextraktion deaktiviert (1 × mit 1 Volumen Phenol / Chloroform: 1 + 1, puffergesättigt). Die Plasmid-DNA wurde aus dem wässrigen Überstand präzipitiert (0,3 M Na-Acetat, 2,5 Volumen Ethanol, absolut; -80 °C, 1 bis 1,5 Stunden) und nach einmaligem Waschen mit 70% Ethanol in TE-Puffer

(pH 8,0) resuspendiert. Der linearisierte Vektor wurde nach SAMBROOK *et al.* (1989) dephosphoryliert (Endvolumen: 15 µl; 0,1 U alkalische Phosphatase (CIP), 1 × CIP-Reaktionspuffer; 37°C, 2 × 30 Minuten; nach 30 Minuten Inkubation wurde nochmals 0,1 U Enzym zugegeben). Die Deaktivierung der alkalischen Phosphatase erfolgte wie nach Linearisierung des Vektors bei der Restriktionsendonuklease beschrieben. Die DNA wurde anschließend mit TE-Puffer (pH 8,0) resuspendiert und ein Aliquot zur visuellen Konzentrationsbestimmung im Agarosegel verwendet.

3.7.2. Ligation

Ein Aliquot (1/20) des aufgereinigten LA-PCR-Produktes (~10 bis 15 ng DNA, je nach durchschnittlicher Fragmentgröße) (Kapitel 3.6.9) wurde mit der dreifachen äquimolaren Menge linearisierten und dephosphorylierten Plasmidvektors (~250 ng DNA) (Kapitel 3.7.1) ligiert (T4-Ligase, nach Herstellerangaben).

3.7.3. Transformation

Ein Aliquot (1/50) der Ligationsreaktion (~5 ng Vektor-DNA) wurde zur Transformation kompetenter Bakterienzellen eingesetzt (*Epiqurian Coli*®, XL2-Blue Ultracompetent cells, bzw. *Escherichia Coli*, Max Efficiency™ DH5α; nach Herstellerangaben). Zur Bestimmung der Transformationseffizienz wurden in einem Kontrollansatz 50 pg pUC-Vektor-DNA transformiert. Verdünnungen der Transformationsansätze wurden nach der Transformation auf entsprechendem Selektionsmedium ausplattiert [LB-Medium 1,5 % Agar, 100 mg × l^{-1} Ampicillin, 48 mg × l^{-1} IPTG, 40 mg × l^{-1} X-Gal]. Nach Inkubation bei 37°C (12 bis 16 Stunden) wurden die Kolonien ausgezählt und die Transformationseffizienz bestimmt. Rekombinante Klone wurden zur Identifikation in ein Raster gepickt und bis zur weiteren Analyse alle drei bis vier Wochen auf frisches Selektionsmedium übertragen.

3.8. Herstellung von Linkeradaptern (JOHNSON, 1990)

Zur Mikroamplifikation mittels LA-PCR werden Adapter benötigt. Die Herstellung von Linkeradaptern erfolgte aus den Oligonukleotiden Mbo20 und Mbo24 (siehe Kapitel 2.4). 1 nmol Mbo24 wurde in Gegenwart von 50 U Polynukleotidkinase (PNK), 2 nmol ATP und

1 × PNK-Puffer phosphoryliert (Endvolumen 50 µl; 37°C, 45 Minuten). Die Reaktion wurde durch Hitzebehandlung gestoppt (68°C, 10 Minuten) und das Enzym einmal mit 1 Volumen Phenol / Chloroform (1 + 1, puffergesättigt) extrahiert. Nach Mikrodialyse gegen TE-Puffer (pH 8,0) (2 x 30 Minuten; jeweils 25 ml) wurde die Konzentration photometrisch bestimmt. Äquimolare Mengen der entsprechenden Oligonukleotide wurden zu einem doppelsträngigen Adaptermolekül hybridisiert (60°C, 1 Stunde; Endkonzentration: [100 µg × ml^{-1}]).

3.9. DNA-Isolierung

3.9.1. Isolierung von Plasmid- und Cosmid-DNA

Durch alkalische Lyse (SAMBROOK *et al.,* 1989) wurde aus rekombinanten Bakterienklonen die Plasmid- bzw. Cosmid-DNA isoliert (siehe hierzu auch Kapitel 3.11.1). Die Bakterienklone wurden als Schüttelkultur über Nacht in LB-Flüssigmedium angezogen (100 mg × l^{-1} Ampicillin; 37°C, 12 bis 14 Stunden; 200 bis 225 rpm). Die Übernachtkultur zur Isolierung von Cosmid-DNA enthielt anstelle von Ampicillin 30 mg × l^{-1} Kanamycin. Hochreine Plasmid- bzw. Cosmid-DNA für Markierungsreaktionen wurde im Mini-, Midi- oder Maxi-Präparationsmaßstab unter Verwendung kommerzieller DNA-Isolierungskits (Qiagen) isoliert. Zur Herstellung von Glycerindauerkulturen wurden zu jeweils 850 µl einer entsprechenden Übernachtkultur 150 µl Glycerin (wasserfrei) zugegeben und bei -80°C gelagert.

3.9.2. Isolierung genomischer Mais-DNA

Zur Isolierung genomischer Mais-DNA wurden Blätter von Gewächshauspflanzen geerntet, mit Ethanol (absolut) gewaschen, in N_2-flüssig eingefroren, lyophyllisiert und gemahlen. Die DNA-Isolierung folgte dem *´CIMMYT Laboratory Protocol´* (HOISINGTON *et al.*, 1994). Die Konzentration der in TE-Puffer (pH 8,0) resuspendierten DNA wurde sowohl photometrisch, als auch durch optische Abschätzung im Agarosegel bestimmt. Außerdem wurde die Schneidbarkeit der DNA mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen überprüft.

3.10. Southern-Hybridisierung und genetische Kartierung von Klonen aus der Mikroamplifikation

Die Southern-Hybridisierung und genetische Kartierung von Klonen aus der Mikroamplifikation erfolgte im Labor von David Hoisington am CIMMYT in Mexiko. Insert-DNA rekombinanter Klone, die nach Koloniehybridisierung mit genomischer Mais-DNA als nicht repetitiv eingestuft worden war, wurde durch PCR-Amplifikation mit einem Anteil von 2,5% DIG-11-dUTP zu 97,5% dTTP markiert (HOISINGTON *et al.*, 1994). Die Hybridisierung der einzelnen Sonden erfolgte nichtradioaktiv auf Filtern mit DNA zehn verschiedener Mais-Inzuchtlinien [CML139 und CML67 (insektenresistent) CML131 und Ki3 (anfällig) sowie sechs Linien aus verschiedenen aktuellen Kreuzungspopulationen], geschnitten mit jeweils zwei Restriktionsendonukleasen (*EcoRI*, *HindIII*). Ein polymorpher Einzelkopieklon wurde mit der Kartierungspopulation Ac7729 × CML247 aus einem aktuellen Kartierungsprogramm hybridisiert.

3.11. Physikalische Kartierung molekularer Sonden

3.11.1. Analyse einer Cosmidbibliothek aus genomischer Mais-DNA

Zur physikalischen Kartierung molekularer Sonden (Klone aus der Mikroamplifikation, bzw. RFLP-Sonden) wurde in einer Cosmidbibliothek nach Cosmiden gesucht, die Sequenzhomologien zu den betreffenden Sonden aufwiesen. Diese Cosmidklone wurden anschließend als Sonde in einer Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung eingesetzt.

Eine Cosmidbibliothek aus genomischer Mais-DNA wurde von Jochen Messing (Rutgers University, NJ, USA) zur Verfügung gestellt. Hierbei handelte es sich um einen amplifizierten Teil einer von Victor Llacca erstellten Bibliothek. Dieser Teil war in 672 Subbibliotheken (sieben Mikrotiterplatten mit jeweils 96 Vertiefungen) aufgeteilt. Jede Subbibliothek enthielt eine Glycerindauerkultur mit einem Gemisch aus jeweils 300 bis 500 verschiedenen Cosmidklonen. Der zur Verfügung gestellte Teil der Bibliothek war im Mittel drei- bis vierfach redundant (LLACA, persönlichen Mitteilung). Die Isolierung spezifischer Cosmidklone erfolgte in drei aufeinanderfolgenden Hybridisierungsstufen unter Verwendung der ent-

sprechenden molekularen Sonde (Abbildung 3).

3.11.1.1. Sondenvorbereitung

Um eine Kreuzhybridisierung zwischen Plasmidvektor der RFLP-, bzw. Mikroamplifikationsklone und dem Cosmidvektor zu vermeiden, durften die Sonden keine Vektoranteile mehr enthalten. In einer Standard-PCR wurde mittels universeller Insertamplifikation unter Verwendung von *´sequencing´* und *´reverse sequencing´* Primern die Insert-DNA amplifiziert (Endvolumen: 100 µl; PCR-Programm 2, Tabelle 1). Die Reste der mitamplifizierten *´multi cloning site´* wurde durch Restriktionsverdau entfernt (entsprechend der Klonierungsstelle mit jeweils 10 U *MboI*, *PstI* oder *EcoRI/XhoI*; Endvolumen: 100 µl; 37°C, 1,5 Stunden). Nach einer Agarosegelelektrophorese (1% Agarosegel, 1 × TAE) wurde die aufgereinigte Insert-DNA durch Gelextraktion zurückgewonnen.

3.11.1.2. Isolierung spezifischer Cosmidklone

Die Isolierung von Cosmidklonen erfolgte in drei aufeinanderfolgenden Hybridisierungsstufen (Abbildung 3). Alle Schritte wurden mit radioaktiv markierten Sonden durchgeführt.

I - Hybridisierung der Sonde mit den Dot-Blot Filtern der Subbibliotheken (Kapitel 3.6.5)
- 5 µl Glycerindauerkultur der hierdurch identifizierten Subbibliotheken in Verdünnungsstufen (1:5, 1:25, 1:125) auf LB-Agarplatten (138 mm, 30 mg × l^{-1} Kanamycin) ausplattiert und nach Inkubation bei 37°C (12 bis 13 Stunden) Koloniefilter hergestellt (Kapitel 3.6.4).

II - Hybridisierung der Sonde mit den Koloniefiltern aus Hybridisierungsstufe I
- Isolierung und Ausstrich von positiven Einzelkolonien
- nach 2 × Vereinzelungsausstrich Einzelkolonien gepickt und Koloniefilter hergestellt

III - Hybridisierung der Sonde mit den in der zweiten Stufe erstellten Koloniefiltern

Die Cosmid-DNA einer homologen Einzelkolonie wurde isoliert (Kapitel 3.9.1) und anschließend die Konzentration photometrisch bestimmt.

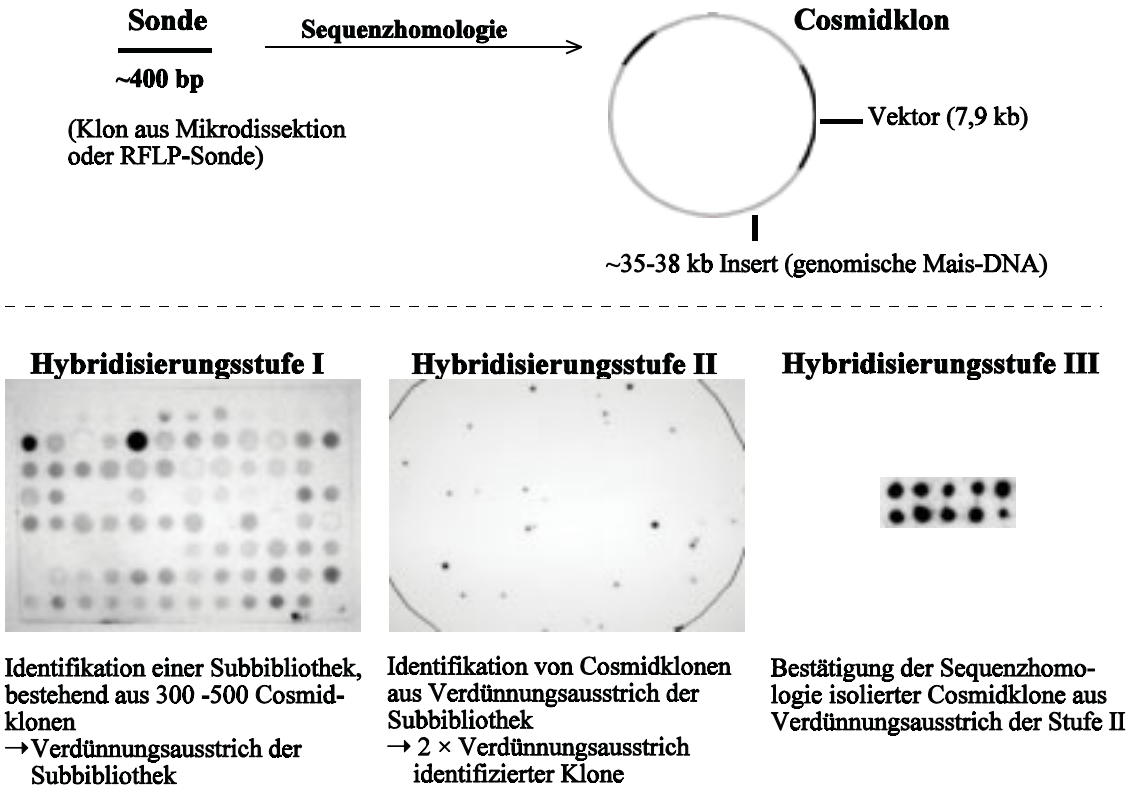


Abbildung 3: **Isolierung von Cosmidklonen, spezifisch für Klone aus der Mikrodissektion oder RFLP-Sonden, aus einer Cosmidbibliothek von Mais**
Durch wiederholtes Hybridisieren in drei aufeinanderfolgenden Stufen wurden spezifische Cosmidklone aus der Bibliothek isoliert

3.11.2. Herstellung von Kompetitor-DNA für die *CISS*-Hybridisierung

Zur Unterdrückung von unspezifischen Hybridisierungssignalen in einer ´chromosomal *in situ* suppression´ Hybridisierung (*CISS*-Hybridisierung; LICHTER *et al.,* 1988) durch repetitive Sequenzen einer Sonde bedarf es einer Vorhybridisierung mit unmarkierter DNA (Kompetitor-DNA). Es wurden zwei unterschiedliche Präparationen von Kompetitor-DNA eingesetzt.

3.11.2.1. *DNaseI*-Behandlung genomischer DNA

Eine Herstellung von Kompetitor-DNA erfolgte durch *DNaseI*-Behandlung genomischer Mais-DNA [Endvolumen: 50 µl; 15 µg DNA; 1 × PCR-Reaktionspuffer der *Taq*-Polymerase (10 mM Tris-HCl, pH 9,0, 50 mM KCl, 1,5 mM $MgCl_2$); 4 µg × ml^{-1} *DNaseI*; Inkubation:

37°C; 45 Minuten]. Ein Aliquot der Reaktion wurde nach Denaturierung (95°C; 10 Minuten) zur Bestimmung der Fragmentgrößenverteilung in einer Agarosegelelektrophorese (1,5% Agarose, 1 × TBE) eingesetzt. War eine Fragmentgröße ≤ 500 bp erreicht, wurde die *DNaseI* durch Zugabe von 5 µl EDTA [300 mM] deaktiviert, andernfalls die Inkubation bei 37°C entsprechend verlängert.

3.11.2.2. Herstellung von C_0t-1 DNA

Die Herstellung von C_0t-1 DNA (hoch- und mittelrepetitive Fraktion der DNA; HAKE UND WALBOT, 1980) zur Kompetition repetitiver Sequenzen in der *CISS*-Hybridisierung erfolgte nach ZWICK *et al.* (1997).

1 bis 2 mg genomische Mais-DNA wurden mit NaCl verdünnt [100 bis 500 ng × μl^{-1} DNA (= C_0); 0,3 M NaCl], in 1,8 ml Cryotubes zu je 1 ml Aliquots aufgeteilt, durch Autoklavieren geschert (3 bis 4 Zyklen; 1 Autoklavierzyklus entspricht je 5 Minuten bei 121°C und 1 bar; bis zu einer Fragmentgröße von 100 bis 1000 bp) und anschließend wieder vereinigt. Die DNA wurde im Wasserbad denaturiert (10 Minuten, 95°C), kurz auf Eiswasser gestellt (10 Sekunden) und anschließend für die berechnete Zeit renaturiert (65°C) [Renaturierungszeit für C_0t-1 DNA: Ts = 1 × (mol × l^{-1})$^{-1}$; bei C_0 = 0,25 g × l^{-1} errechnet sich eine Konzentration von 7,375 × 10^{-4} mol × l^{-1}, woraus eine Renaturierungszeit Ts von 1356 Sekunden folgt]. Durch anschließende Inkubation mit *S1*-Nuklease wurden die nicht renaturierten DNA-Einzelstränge verdaut [1 × Reaktionspuffer (33 mmol × l^{-1} Na-Acetat, 50 mmol × l^{-1} NaCl, 0,03 mmol × l^{-1} $ZnSO_4$, pH 4,5), 1 U × μg^{-1} *S1*-Nuklease, 37°C, 8 bis 10 Minuten]. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 vol. Phenol (TE-gesättigt) gestoppt. Der wässrige Überstand wurde mit 1 Volumen Phenol/$CHCl_3$/Iso-Amylalkohol (25/24/1) und anschließend mit 1 Volumen $CHCl_3$/Iso-Amylalkohol (24/1) extrahiert, die DNA präzipitiert (2,5 Volumen Ethanol, absolut, -80°C, 2 Stunden) und in 200 µl TE (pH 8) resuspendiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch und mittels Agarosegelelektrophorese.

3.11.3. Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

3.11.3.1. Vorbereitung der Chromosomenpräparate

Zur Vorbereitung der Chromosomenpräparate kamen zwei Methoden zum Einsatz:

I Die Chromosomenpräparate (Kapitel 3.3.2) wurden nach kurzem Spülen in 0,1 × SSC (20 bis 25°C, 10 Sekunden) in 4% Paraformaldehyd-(PFA)-Lösung (w/v) fixiert (20 bis 25°C, 10 Minuten). Nach drei Waschschritten in 2 × SSC (20 bis 25°C, je 2 Minuten) folgte die Denaturierung [70% Formamid (v/v), 2 × SSC] (70°C, 2 Minuten) und Dehydrierung in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70%, 90%, 100%, -20°C, je 5 Minuten). Die luftgetrockneten Präparate wurden anschließend zur Hybridisierung eingesetzt.

II Nach dem Waschen der Präparate in 2 x SSC (20 bis 25°C, 5 Minuten) folgte eine Inkubation in *RNaseA* Lösung [100 µg × ml^{-1} *RNaseA* in 2 × SSC] (37°C, 1 Stunde). Nach dreimaligem Waschen in 2 × SSC (20 bis 25°C, jeweils 5 Minuten) wurden die Präparate in Pepsin inkubiert [5 µg × ml^{-1} Pepsin in 0,01 N HCl] 37°C, 6 bis 7 Minuten), einmal in Wasser (20 bis 25°C, 2 Minuten) und zweimal in 2 × SSC (20 bis 25°C, jeweils 5 Minuten) gewaschen. Nach Fixierung in 1% PFA-Lösung (w/v) erfolgte die Denaturierung und Entwässerung wie bei (I) beschrieben.

3.11.3.2. Vorbereitung der Sonden (LICHTER *et al.*, 1988; BOEHRINGER, 1996)

Die zur Hybridisierung vorgesehene Menge markierter Sonden-DNA wurde mit einem 50-fachen Überschuß an Hefe tRNA und DNA aus Heringsperma, sowie unterschiedlicher Mengen an Kompetitor-DNA gefällt (0,3 M Na-Acetat, 2,5 Volumen Ethanol, absolut, -80°C, 2 Stunden). Das Pellet wurde in 75% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 4 µl Wasser resuspendiert.

Folgende DNA-Konzentrationen wurden zur Hybridisierung pro Objektträger eingesetzt:

- 10 µl des biotinmarkierten LA-PCR-Produktes
  (Kapitel 3.6.6.2; 150 bis 200 ng - nach visueller Abschätzung im Agarosegel)
- 200 bis 300 ng der biotinmarkierten Cosmid-DNA (Kapitel 3.6.6.1)
- 50 bis 100 ng der biotin- oder DIG-markierten maiszentromerspezifischen Sonde *´CentC´* (ANANIEV *et al.*, 1998); Verwendung als interne Positivkontrolle, sowie zur physikalischen Kartierung von Sonden in Relation zum Zentromer (Fällung der Sonde

ohne Kompetitor-DNA)

3.11.3.3. Hybridisierung

Die jeweils in 4 µl Wasser resuspendierten, vorbereiteten Sonden wurden in Hybridisierungslösung [50% entionisiertes Formamid (v/v), 2 × SSC, 10% Dextransulfat (w/v)] aufgenommen (Endvolumen: 20 µl pro 24 x 40 mm Fläche) und bei 75°C (10 Minuten) denaturiert. Bei Hybridisierungsansätzen ohne Kompetition (FISH) wurden die Sonden anschließend direkt für drei Minuten auf Eis inkubiert. Bei Ansätzen mit Kompetition (*CISS*-Hybridisierung) folgte nach der Denaturierung eine Vorhybridisierung (37°C, 1 Stunde). Pro Objektträger wurden 20 µl Hybridisierungslösung inklusive der denaturierten und ggf. vorhybridisierten Sonde aufgetragen, mit einem Deckglas (24 × 40 mm, ethanolgereinigt und abgeflammt) abgedeckt und inkubiert (37°C, mindestens 12 Stunden; Feuchtekammer). Anschließend wurden die Objektträger in Glasküvetten bei 40°C im Wasserbad mit verschiedenen Waschlösungen gewaschen (2 × SSC, 2 × 5 Minuten; 50% Formamid (v/v), 2 × SSC, 1 × 10 Minuten; 2 × SSC, 2 × 5 Minuten). Beim ersten Waschschritt wurde das Deckglas entfernt, nach dem letzten Waschschritt wurde die Küvette mit den Objektträgern aus dem Wasserbad genommen und für die Dauer von fünf Minuten auf 20-25°C abkühlen gelassen. Die Präparate wurde anschließend in 2 × SSC (20 bis 25°C, 5 Minuten), sowie in 4 × SSC mit 0,1% Tween20 (v/v) (20 bis 25°C, 5 Minuten) inkubiert.

3.11.3.4. Signaldetektion (LICHTER *et al.*, 1988)

Nach dem letzten Waschschritt wurden die Objektträger zur Unterdrückung unspezifischer Hintergrundsignale in einer Blockierungslösung [4 × SSC, 3% BSA (w/v)] inkubiert. Hierzu, sowie bei der folgenden Detektion und Signalverstärkung, wurden jeweils 300 µl der entsprechenden Lösung auf die Präparate aufgetragen, mit einem Deckglas (24 × 60 mm) abgedeckt und in einer Feuchtkammer bei 37°C (30 Minuten) inkubiert. Nach kurzem Spülen in 4 × SSC mit 0,1% Tween20 (v/v) (20 bis 25°C) folgte die Signaldetektion in Abhängigkeit von der Sondenmarkierung.

I Biotinmarkierte Sonden mit Verstärkungsreaktion

Nach den Posthybridisierungswaschschritten folgte die erste Signaldetektion [5 µg × ml^{-1} FITC-Avidin, 4 × SSC, 1% BSA (w/v), 0,1% Tween20 (v/v)] (37°C, 30 Minuten) mit anschließendem dreimaligem Waschen in 4 x SSC mit 0,1% Tween20 (v/v) (37°C, jeweils 5

Minuten). Es folgte eine Verstärkungsreaktion [5 µg × ml^{-1} Anti-Avidin, biotinyliert, 4 × SSC, 1% BSA (w/v), 0,1% Tween20 (v/v)] (30 Minuten), erneutes dreimaliges Waschen (s.o.), eine zweite Signaldetektion (s.o.) und ein abschließendes dreimaliges Waschen (s.o.). Nach dem letzten Waschschritt wurden die Präparate in jeweils 30 µl Antifadingmittel [1 µg × ml^{-1} Propidiumjodid in *´Vectashield mounting medium´*] eingebettet und mit einem Deckglas eingedeckelt (24 × 40 mm ethanolgereinigt und abgeflammt).

II DIG-markierte Sonden ohne Verstärkungsreaktion

Die Signaldetektion nach den Posthybridisierungswaschschritten erfolgte mit Anti-DIG-Rhodamin [5 µg × ml^{-1} in 4 × SSC, 1% BSA (w/v), 0,1% Tween20 (v/v)] (37°C, 30 Minuten) mit anschließendem dreimaligem Waschen in 4 × SSC mit 0,1% Tween20 (v/v) (37°C, jeweils 5 Minuten). Zur Hintergrundfärbung der Chromosomenpräparate wurde 1 µg × ml^{-1} DAPI verwendet

Bei einer Doppelhybridisierung mit biotin- und DIG-markierten Sonden erfolgte die Signaldetektion der DIG-markierten Sonde parallel zur ersten Signaldetektion der biotinmarkierten Sonde, mit anschließender Verstärkungsreaktion mit Anti-Avidin. In diesem Falle wurde sowohl Propidiumjodid, als auch DAPI zur Hintergrundfärbung verwendet [jeweils 1 µg × ml^{-1}].

Nach einer waagerechten Lagerung bei 4°C (mindestens 1 Stunde) wurden die Präparate an den Kanten der Deckgläser mit farblosem Nagellack verschlossen. Die Detektion der Fluoreszenzsignale erfolgte am Inversmikroskop mit entsprechender Ausrüstung für Propidiumjodid und FITC Epifluoreszenz.

4. Ergebnisse

4.1. Präparation und Identifikation von Chromosomen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Chromosomenpräparate sowohl als Ausgangsmaterial für die Mikrodissektion zur Erstellung segmentspezifischer DNA-Bibliotheken, als auch für die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) zur physikalischen Kartierung eingesetzt. Beide Ansätze erforderten sicher identifizierbare Chromosomen in ausreichender Anzahl innerhalb eines Präparates. Darüber hinaus mußten für den Einsatz zur Erzeugung chromosomen-segmentspezifischer DNA-Bibliotheken zusätzliche Vorgaben erfüllt sein:

II Identifizierbarkeit des entsprechenden Chromosoms oder eines Teilbereiches unter Ausschluß DNA-degradierender Färbetechniken

II das dissektierte Chromatin mußte einer Klonierung zugänglich sein.

Zur Mikrodissektion wurden neben mitotischen Metaphasechromosomen auch Pachytän-chromosomen eingesetzt. Bei der FISH kamen nur mitotische Metaphasechromosomen zum Einsatz.

4.1.1. Pachytänchromosomen

4.1.1.1. Ausgangsmaterial

Zur Präparation von Pachytänchromosomen wurden Pollenmutterzellen (PMZ) verwendet. Als Spenderpflanzen diente die, gegenüber SWCB und SCB resistente Linie CML139, sowie die, aufgrund ihrer besonderen Eignung zur Chromosomenpräparation beschriebene Linie KYS (DEMPSEY, 1994). Der Zeitpunkt der Rispenernte war jahreszeit- und genotypabhängig. So verkürzte sich die Dauer zwischen Aussaat und Ernte von durchschnittlich 13,5 Wochen (Aussaat im Dezember/Januar) bei beiden verwendeten Genotypen auf etwa zehn Wochen (Aussaat im Juni), um anschließend wieder auf das Niveau der Wintermonate anzusteigen (Abbildung 4).

Aufgrund der Korrelation zwischen Antherenlänge und Entwicklungsstadium der PMZ war es möglich, eine Vorauswahl zwischen den Blüten einer geernteten Rispe zu treffen. So waren bei frisch geerntetem Material der Linie CML139 bei einer Antherenlänge von etwa 1,9 mm, bei der Linie KYS ab 2,1 mm PMZ im Pachytänstadium zu erwarten. Mit zunehmender Lagerzeit zwischen Rispenernte und Präparation, bzw. Fixierung waren entsprechend kürzere Antheren zu verwenden. Abweichungen in der synchronen Entwicklung der PMZ wurden bei beiden Genotypen vor allem zwischen den drei kürzeren Antheren einer Blüte beobachtet. Hingegen war die Synchronisation zwischen den drei längeren Antheren konstanter. Auch wurde ein Einfluß der Vegetationszeit auf die Antherenpräparation beobachtet. So nahm die Präparationseignung mit zunehmender Vegetationsdauer ab, wobei im Vergleich zwischen den Genotypen bei der Linie CML139 gegenüber der Linie KYS eine stärkere Abnahme der Präparationseignung in den Wintermonaten beobachtet wurde.

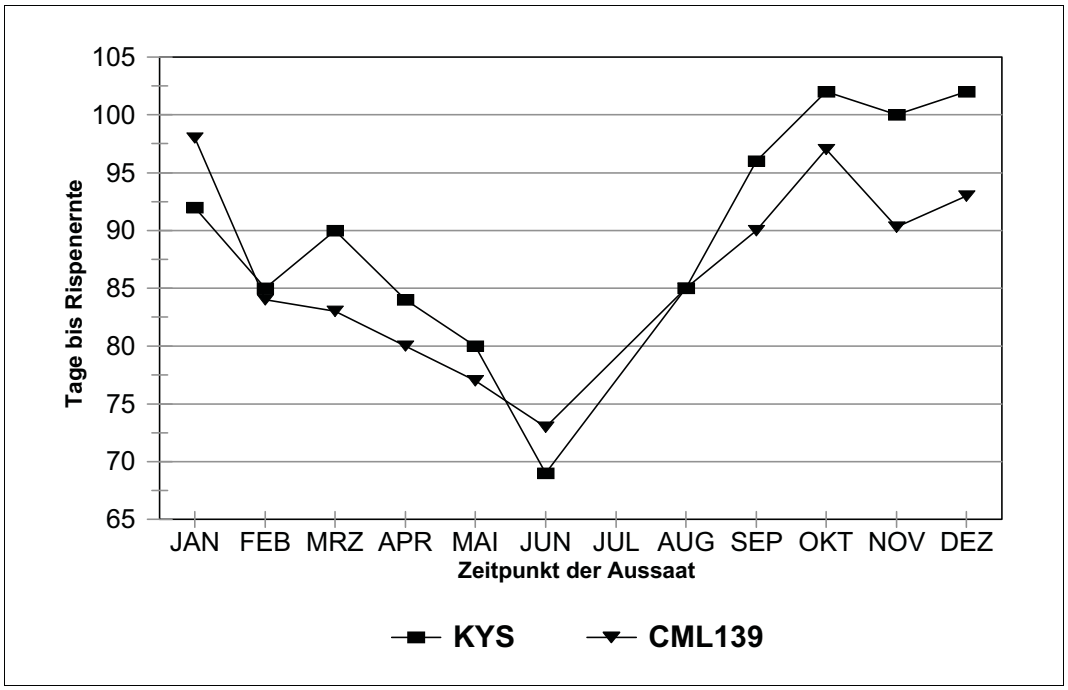


Abbildung 4: Abhängigkeit der Vegetationsdauer (Tage bis Rispenernte) vom Aussaatzeitpunkt.
Für die Maisgenotypen KYS und CML139**;** gemittelt über die Jahre 1995 und 1996.

4.1.1.2. Präparation

Zur Präparation von Pachytänchromosomen wurde im wesentlichen die von STEIN (1998) beschriebene Präparationstechnik verwendet. Um eine Identifikation und Dissektion von Pachytänchromosomen in ungefärbten Trockenpräparaten zu ermöglichen, mußte bei der Präparation besonders auf das Spreitungsverhalten der Chromosomen geachtet werden. Nur freiliegende und kondensiertere Chromosomen aus dem späteren Pachytän waren cytologisch eindeutig bestimmbar. Die Waschschritte und das Quellen von fixiertem Material vor der Präparation in Wasser haben sich in diesem Zusammenhang als vorteilhaft erwiesen. Leichtes Tippen mit der Pinzette auf das Deckglas bewirkte bei der Präparation das Platzen der PMZ. Die so erzeugten Strömungsbewegungen begünstigten ebenfalls das Spreitungsergebnis. Die ungefärbten Trockenpräparate konnten mit Hilfe der Phasenkontrastoptik mikroskopisch betrachtet und analysiert werden. Geeignete Positionen wurden mittels einer elektronischen Steuerung des Mikroskoptisches abgespeichert, damit sie zu einem späteren Zeitpunkt wiedergefunden werden konnten.

4.1.1.3. Identifikation

Die Identifikation der einzelnen Chromosomen erfolgte anhand ihrer morphologischen Merkmale, v.a. ihrer Länge, der Lage des Zentromers, sowie der mehr oder weniger deutlich sichtbaren heterochromatischen Bereiche. Zahlreiche Chromosomen, u.a. auch Chromosom 9, konnten oftmals eindeutig identifiziert werden. Die Ausbeute an geeigneten Präparaten, die neben einer Identifikation von Chromosom 9 auch eine Mikrodissektion entsprechender Bereiche durch eine frei zugängliche Lage abseits von anderen Chromosomen ermöglichte, war jedoch gering (Abbildung 5).

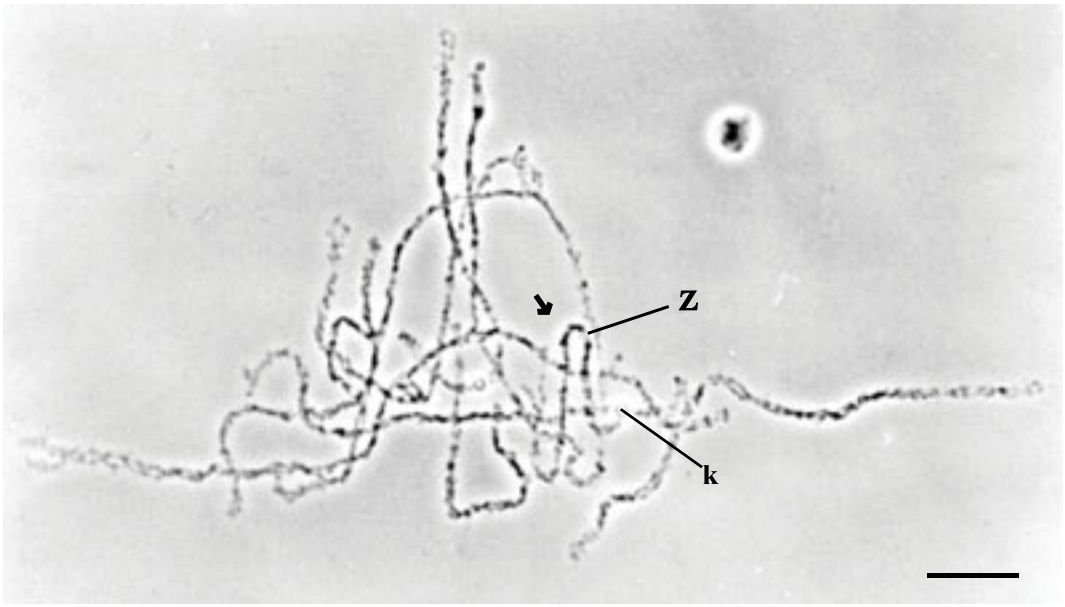


Abbildung 5: Präparation von Pachytänchromosomen der Linie KYS
In diesem Präparat ist Chromosom 9 (Pfeil) aufgrund seiner morphologischen Merkmale (Länge, Lage des Zentromers (Z), beidseitig des Zentromers liegende heterochromatische Bereiche, terminaler *knob* (k) an 9S) identifizierbar, jedoch nur eingeschränkt dissektierbar. (Balken entspricht 10 µm)

4.1.2. Mitotische Metaphasechromosomen

4.1.2.1. Ausgangsmaterial

Als Ausgangsmaterial zur Präparation mitotischer Metaphasechromosomen dienten Wurzelmeristeme der *B-A* Translokationslinien TB-9Sb und TB-9Lc, einer B-Chromosomen haltigen BMSC-Linie, sowie der Linie KYS. Durch Vorbehandlung der Meristeme drei bis vier Tage alter Wurzeln mit dem Spindelgift 8-Hydroxyquinolin konnte ein ausreichend hoher Anteil mitotischer Zellen erreicht werden.

4.1.2.2. Präparation

Ungefärbte Trockenpräparate wurden mit Hilfe enzymatischer Mazeration hergestellt. Die Dauer der Mazeration war von dem verwendeten Fixans abhängig und betrug mit der verwendeten Enzymlösung bei Fixierung in 70% Ethanol etwa 50 bis 55 Minuten, bei Fixierung in Carnoy-Lösung-I 20 bis 25 Minuten. Bei längeren Inkubationszeiten wurden die Zellwände so stark abgebaut, daß bei mechanischer Mazeration des Meristemgewebes die Zellen bereits

zerstört wurden und die Chromosomen später über den gesamten Objektträger verteilt waren. Dadurch waren nur selten vollständige Chromosomensätze vorzufinden, und einzelne Chromosomen oftmals nur schwer zu identifizieren. Zu kurze Inkubationszeiten führten hingegen zu einem zu geringen Abbau der Zellwände, was ein Platzen der Zellen verhinderte und eine mangelhafte Spreitung zur Folge hatte.

4.1.2.3. Identifikation

Durch die Verwendung der *B-A* Translokationslinien TB-9Sb und TB-9Lc war eine eindeutige Zuordnung des kurzen (TB-9Sb), oder langen (TB-9Lc) Arms von Chromosom 9 durch die telozentrischen *B-9* Translokationschromosomen möglich (Abbildung 6). Die Identifikation anderer Chromosomen aufgrund morphologischer Eigenschaften (Länge der Chromosomen, Lage des Zentromers) war nicht immer zuverlässig möglich.

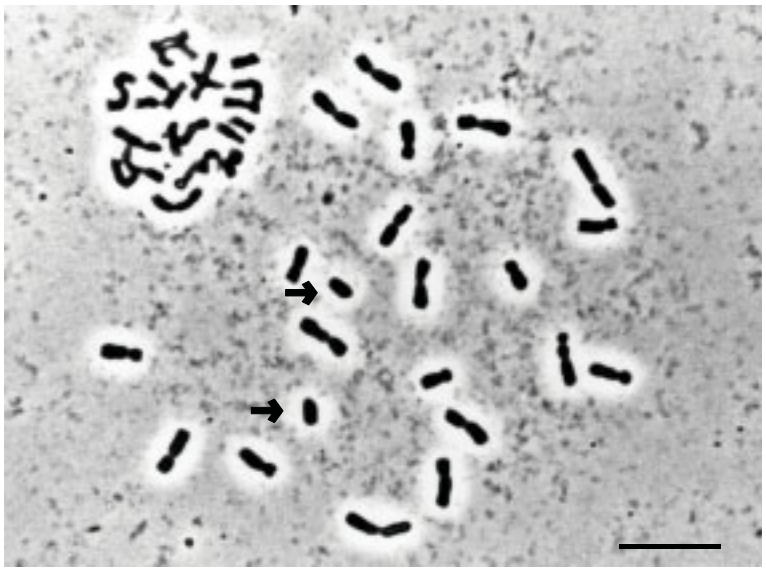


Abbildung 6: Mitotische Metaphasechromosomen der Linie TB-9Lc
Die beiden *B-9* Translokationschromosomen sind als telozentrische Chromosomen leicht identifizierbar (Pfeil). Eine Unterscheidung zwischen den Chromosomen 9 und 9-B ist nicht möglich. (Balken entspricht 10 µm)

4.2. Optimierung der Mikroamplifikation dissektierter Chromosomensegmente

STEIN *et al*. (1998) etablierten die Amplifizierung maisspezifischer DNA aus Mais-Pachytänchromosomen mit der LA-PCR, sowie die Erstellung segmentspezifischer DNA-Bibliotheken aus LA-PCR-Produkten. Zur Mikroamplifikation dissektierter Chromosomensegmente werden diese nach Proteinase K Behandlung und Restriktionsverdau mit spezifischen Adaptern ligiert, die die entsprechende Primersequenz für die nachfolgende PCR tragen. Hierbei sind mehrere biochemische Arbeitsschritte notwendig, die mit Hilfe verschiedener Positiv- und Negativkontrollen verfolgt und kontrolliert werden können. In diesem Zusammenhang wurde in der Negativkontrolle I der LA-PCR (Sammeltropfen ohne DNA) eine DNA-Amplifikation festgestellt, die sich in einer Southern-Hybridisierung als nicht homolog zu Mais herausstellte. Um diese DNA-Amplifikation in der Negativkontrolle auszuschalten, bzw. zu minimieren, war in der vorliegenden Arbeit zunächst eine Identifikation der Kontaminationsquelle nötig.

4.2.1. Bestimmung der Herkunft von DNA-Kontaminationen in der LA-PCR

Zur Identifikation der DNA-Quelle, die eine DNA-Amplifikation in der Negativkontrolle verursacht, wurde eine Mikroamplifikation und Klonierung von Chromosomensegmenten entsprechend den Protokollen von PONELIES *et al.* (1997) und STEIN (1998) durchgeführt.

4.2.1.1. Mikrodissektion und -amplifikation mittels LA-PCR

Ausgehend von Pachytänchromosomen der Linie KYS wurden das Genom einer Zelle, sowie 10 Segmente des zentromernahen Bereichs aus dem langen Arm von Chromosom 9 dissektiert (Abbildung 7) und in einer LA-PCR amplifiziert. Die Amplifikationsprodukte umfaßten DNA-Fragmente in einem Größenbereich von 200 bis 1600 bp (Abbildung 8 A, Spur 1 + 2). Die Positivkontrolle I (1,5 pg DNA-Lösung in LA-PCR; Abbildung 8 A, Spur 4) ergab ein in der Größenverteilung vergleichbares Amplifikationsprodukt. Die Negativkontrolle I (Sammeltropfen ohne Segmente; Spur 3), zeigte ebenfalls ein Produkt mit der gleichen Größenverteilung. Die Negativkontrolle II (PCR-Reaktionsansatz ohne DNA) führte zu keinem nachweisbaren Amplifikat (Spur 5).

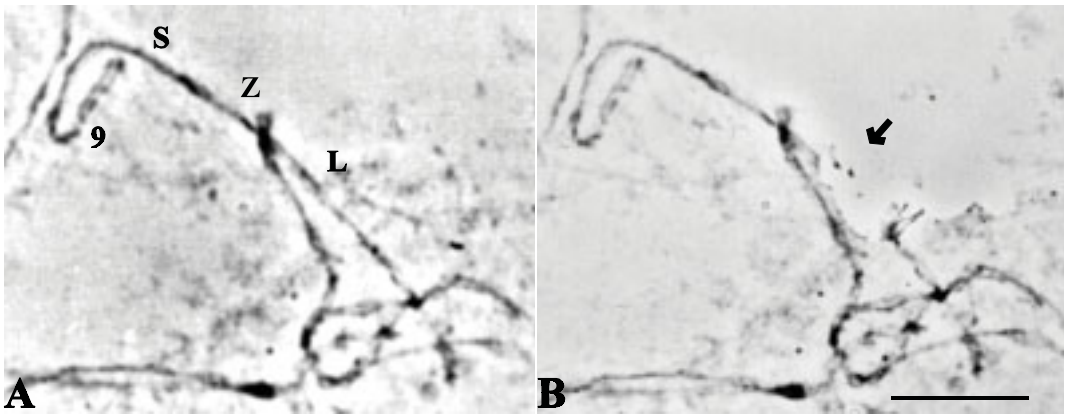


Abbildung 7: **Mais Pachytänchromosom 9 vor (A) und nach (B) Mikrodissektion des zentromernahen Bereichs des langen Arms 9L (Pfeil)**.
Z kennzeichnet die Zentromerregion, *S* den kurzen und *L* den langen Chromosomenarm. (Balken entspricht 10 µm)

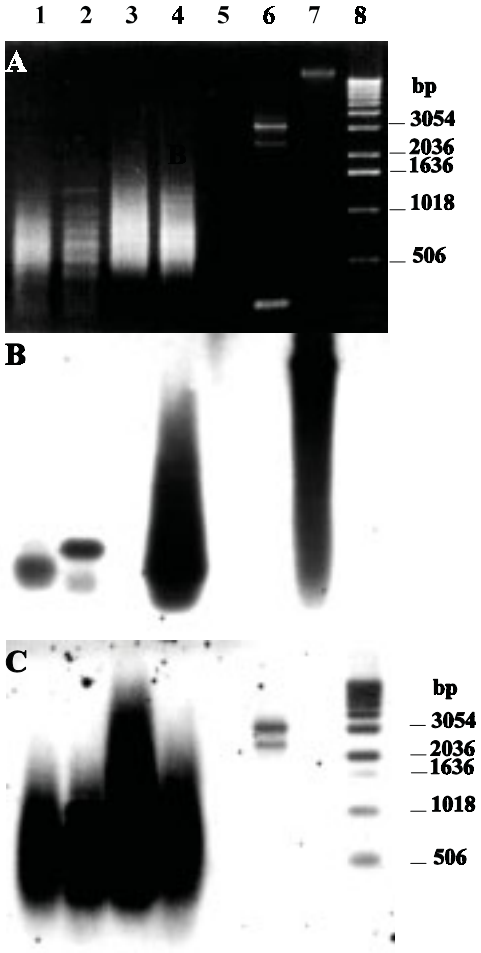


Abbildung 8: LA-PCR mit Segmenten aus Pachytänchromosom 9L (Linie KYS)

A) Gelelektrophorese der PCR-Produkte:

1) amplifizierte DNA eines mikrodissektierten Genoms; 2) amplifizierte DNA von 10 Segmenten von Chromosom 9L; 3) Negativkontrolle I (Sammeltropfen ohne DNA); 4) Positivkontrolle I (1,5 pg Mais DNA); 5) Negativkontrolle II (PCR-Ansatz ohne DNA); 6) Positivkontrolle II (10 ng Plasmid DNA mit Sequenzierprimer); 7) Positivkontrolle III (100 ng Mais-DNA); 8) Längenmarker (1 kb Leiter)

B) Southern-Hybridisierung mit DIG-markierter Mais-DNA. Das Amplifikationsprodukt der mikrodissektierten Chromosomensegmente (Spuren 1+2) zeigt ein deutliches Hybridisierungssignal, wogegen die Negativkontrolle I keine Hybridisierung aufweist.

C) Southern-Hybridisierung mit dem DIG-markiertem Amplifikationsprodukt der Negativkontrolle I (Spur 3)

4.2.1.2. Klonierung des LA-PCR Produktes

Nach entsprechender Aufreinigung wurde das Amplifikationsprodukt aus den zehn mikrodissektierten Chromosomensegmenten (Kapitel 4.2.1.1) in einen linearisierten und dephosphorilierten pUC18-Vektor ligiert und in *Epicurian Coli* transformiert. Berechnet auf 100 µl LA-PCR-Produkt ergab die Transformation $2{,}8 \times 10^5$ rekombinante Klone.

4.2.1.3. Analyse der Amplifikationsprodukte und der rekombinanten Klone

Die DNA der LA-PCR-Produkte (Abbildung 8 A) wurde in einer Southern-Hybridisierung analysiert. Eine nichtradioaktive Hybridisierung mit DIG-markierter genomischer Mais-DNA der Linie CML139 führte bei PCR-Produkten aus dissektierten Chromosomensegmenten zu einem Hybridisierungssignal (Abbildung 8 B; Spur 1 und 2). Die Positivkontrollen I + III (I: 1,5 pg Mais-DNA in LA-PCR; III: 100 ng Mais-DNA) zeigten ebenfalls eine Hybridisierung mit genomischer Mais-DNA. Bei den Negativkontrollen I + II (I: keine DNA in Sammeltropfen; II: keine DNA in PCR) konnte keine Homologie zu Mais-DNA nachgewiesen werden (Abbildung 8 B; Spur 3).

Um eine Aussage über den Anteil mittel- bis hochrepetitiver DNA-Insertionen bei der Klonierung (Kapitel 4.2.1.2) dissektierter und LA-PCR amplifizierter Chromosomensegmente (Kapitel 4.2.1.1) zu machen, wurden eine Stichprobe individueller Klone untersucht. 250 rekombinante Klone wurden in einer nichtradioaktiven Koloniehybridisierung mit DIG-markierter genomischer Mais-DNA hybridisiert. Ein Klon konnte mit einer mittel- bis hochrepetitiven Mais-DNA-Insertion identifiziert werden.

Zur Bestimmung der Größe der DNA-Insertionen wurde aus einer Stichprobe von insgesamt 52 Klonen die Plasmid-DNA isoliert und nach Restriktionsverdau mit den Restriktionsendonukleasen *XbaI* und *PstI* in einer Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Die Größenverteilung der DNA-Insertionen erstreckte sich über einen Bereich von 200 bis 800 bp (nicht gezeigt). Zur weiteren Analyse in einer Southern-Hybridisierung wurde die DNA auf einen Nylonfilter übertragen. Eine Hybridisierung mit DIG-markierter Mais-DNA zeigte weder mit den Plasmidvektoren, noch mit den DNA-Insertionen ein Hybridisierungssignal (nicht gezeigt).

Die DNA-Amplifikation der Negativkontrolle I wies keine Homologie mit Mais-DNA auf. Zur Identifizierung der Quelle dieser DNA-Amplifikation wurde eine Homologie zu den übrigen Versuchsvarianten überprüft. Die DNA der Negativkontrolle I wurde nichtradioaktiv mit DIG markiert und in verschiedenen Southern-Hybridisierungen als Sonde eingesetzt.

Die Hybridisierung der Amplifikationsprodukte aus der Negativkontrolle I zeigte deutliche Homologien zu den LA-PCR-Produkten mikrodissektierter Chromosomensegmente (Abbildung 8 C; Spur 1 + 2), sowie mit der Positivkontrolle I (1,5 pg DNA in LA-PCR; Spur 4). Des weiteren war eine Homologie zur Vektorbande der Positivkontrolle II (Plasmid-DNA mit Sequenzierprimer; Spur 6) und zu dem aus pBR322 Plasmid-DNA hervorgegangenen Längenstandard (Spur 8) zu beobachten. Die Hybridisierung mit diesen beiden zuletzt genannten bakteriellen Sequenzen gibt einen ersten Hinweis auf die mögliche Quelle der Kontamination in der PCR-Reaktion. Keine Hybridisierung erfolgte mit der Negativkontrolle II (keine DNA in PCR; Spur 5), der amplifizierten *´multi cloning site´* der Positivkontrolle II (Spur 6), sowie mit der Positivkontrolle III (100 ng Mais-DNA; Spur 7).

Eine Hybridisierung der DNA der Negativkontrolle I mit der Stichprobe 250 rekombinanter Klone in einer Koloniehybridisierung führte bei jeder Kolonie zu einem deutlichen Hybridisierungssignal (nicht gezeigt). Weitere Southern-Hybridisierungen (isolierte und aufgetrennte Plasmid-DNA von 52 individuellen Klonen; nicht gezeigt) ergaben eine Homologie zu den Vektorbanden, verschiedenen Insertbanden, sowie dem Längenstandard.

Eine Übersicht der Ergebnisse aus den Hybridisierungsreaktionen zeigt Tabelle 5. Diese Ergebnisse legen nahe, daß die DNA, die zu einem Amplifikationsprodukt in der Negativkontrolle I der LA-PCR führte, eine Verunreinigung bakteriellen Ursprungs ist. Die Quelle dieser Verunreinigung ist bei den verwendeten Enzymlösungen zu vermuten und wäre somit herstellerbedingt, da andere Kontaminationsquellen durch entsprechende Maßnahmen ausgeschlossen wurden (Kapitel 3.5.3).

Tabelle 2: Ergebnisse aus den Hybridisierungsreaktionen mit genomischer Mais-DNA und dem Amplifikationsprodukt der Negativkontrolle I der LA-PCR

A) Sonde: genomische Mais-DNA (Hybridisierung: ja/nein)

B) Sonde: Amplifikationsprodukt der Negativkontrolle I der LA-PCR (Hybridisierung: ja/nein)

DNA auf Filter	A	B
• Mikrodissektierte Segmente (Spur 1+2)	ja	ja
• Negativkontrolle I (keine Segmente in Sammeltropfen; Spur 3)	nein	ja
• Positivkontrolle I (1,5 pg DNA in LA-PCR; Spur 4)	ja	ja
• Negativkontrolle II (keine DNA in PCR; Spur 5)	nein	nein
• Positivkontrolle II (Plasmid-DNA mit Sequenzierprimer; Spur 6)	nein	ja[1)]
• Positivkontrolle III (100 ng Mais-DNA; Spur 7)	ja	nein
• Längenstandard (1 kb Leiter)	nein	ja
• 250 rekombinante Klone	ja[2)]	ja[3)]
• Plasmid-DNA von 52 rekombinanten Klonen	nein	ja[4)]

1) Hybridisierung mit der Vektorbande, nicht mit der amplifizierten *´multi cloning site´*; 2) Hybridisierung mit einer von 250 Kolonien; 3) Hybridisierung mit allen Kolonien; 4) Hybridisierung mit der Vektorbande und einigen Insertsequenzen

4.2.2. Verminderung der Amplifikation von DNA-Kontaminationen

Zur Amplifikation kleinster DNA Mengen mit Hilfe der LA-PCR wurden nach einem Restriktionsverdau die DNA-Fragmente mit einem komplementären Linkeradapter ligiert. Dieser Adapter trug die spezifische Sequenz des PCR-Primers. Alle DNA-Sequenzen, die vor, oder zum Zeitpunkt des Restriktionsverdaus der Reaktion zugeführt wurden, können auf diese Weise amplifiziert werden. Nachdem die Quelle der DNA-Kontamination bei den verwendeten Enzymlösungen vermutet wurde, war für eine Reduzierung, oder Ausschaltung der Amplifikation bakterieller DNA **i)** eine Reduzierung der Enzymkonzentrationen, **ii)** eine Verwendung von Enzymen anderer Hersteller, oder **iii)** der Verzicht auf bestimmte Enzyme durch Wahl eines alternativen Ansatzes notwendig.

4.2.2.1. Modifizierung der Mikroamplifikation mittels LA-PCR

Um eine mögliche Kontamination durch herstellerbedingte DNA-Verunreinigungen der Restriktionsendonuklease zu minimieren, wurde in einer Testreihe die Möglichkeit einer Reduzierung der Enzymkonzentration untersucht. Hierzu wurden jeweils 1,5 pg Mais-DNA mit unterschiedlichen Mengen Restriktionsenzym verdaut. Adapter wurden ligiert und in einer LA-PCR amplifiziert. Jede Enzymkonzentration wurde in einer Negativkontrolle ohne DNA-Zugabe getestet (Abbildung 9 A). Die Inkubationszeit des Restriktionsverdaus wurde auf 17 Stunden verlängert.

Bei Verwendung von 10 U Restriktionsendonuklease je 10 µl Reaktionsansatz (Spur 1 und 4) war das Amplifikationsprodukt durch ein Bandenmuster charakterisiert. Die Konzentration dieser DNA-Amplifikationen war geringer, als bei den Amplifikationen unter Einsatz niedrigerer Mengen an Restriktionsenzym. Sowohl bei 1 U, als auch bei 0,1 U Enzym (je 10 µl Reaktionsansatz) zeigte sich ein deutliches PCR-Produkt bei den Varianten mit 1,5 pg DNA-Ausgangsmenge über einen Größenbereich von 200 bis über 2000 bp. Die entsprechende Negativkontrolle bei 1U Enzym (Spur 5) zeigte ein, gegenüber dem Restriktionsverdau mit DNA-Zugabe, in der Konzentration abgeschwächtes Amplifikationsprodukt. Bei 0,1 U Enzym war ohne DNA-Zugabe (Spur 6) kein Amplifikat erkennbar. In einer Hybridisierungsreaktion mit DIG-markierter Mais-DNA konnte bestätigt werden, daß es sich bei den Amplifikationsprodukten nach Zugabe von 1,5 pg DNA um Mais-DNA handelt. Hingegen zeigten die Amplifikationen der Negativkontrolle keine Hybridisierung mit Mais-DNA (Abbildung 9 B).

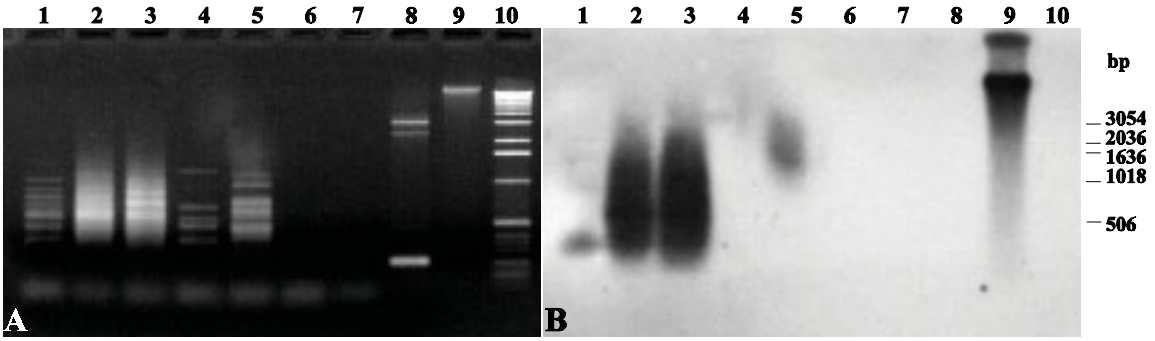


Abbildung 9: **Amplifikation mittels modifizierter LA-PCR**

A) Agarosegelelektrophorese der Amplifikationsprodukte

1-3) 1,5 pg DNA-Lösung; 4-6) Negativkontrollen ohne DNA-Zugabe; 1+4) Restriktionsverdau mit 10 U *MboI* [1)]; 2+5) Restriktionsverdau mit 1 U *MboI* [1)]; 3+6) Restriktionsverdau mit 0,1 U *MboI* [1)]; 7) Negativkontrolle der PCR (keine DNA-Zugabe); 8) Positivkontrolle der PCR (Plasmid-Vektor mit Sequenzierprimer); 9) Positivkontrolle der Hybridisierungsreaktion (100 ng Mais-DNA); 10) Längenmarker

[1)] jeweils pro 10 µl Reaktionsvolumen

B) Southern-Hybridisierung mit DIG-markierter Mais-DNA

Die Spuren 1-3 zeigen eine Amplifikation von Mais-DNA

Durch die veränderten Reaktionsbedingungen (Reduzierung der Konzentration der Restriktionsendonuklease auf 0,1 U pro 10 µl Reaktionsansatz, mit gleichzeitiger Verlängerung der Inkubationszeit auf 17 Stunden) konnte eine quantitative Erhöhung des Maisamplifikationsproduktes, sowie eine Reduktion der Kontamination bewirkt werden. Dies führte bei Amplifikation von 1,5 pg DNA-Lösung zu einer Ausschaltung der DNA-Amplifikation in der Negativkontrolle.

4.2.2.2. Mikroamplifikation mittels *´degenerate-oligonucleotide-primed-PCR´* (DOP-PCR, TELENIUS *et al.,* 1992)

Die Möglichkeit zur Verminderung, oder Ausschaltung einer Kontaminationsquelle bei der Mikroamplifikation durch Verzicht auf bestimmte Enzyme ist durch Wahl eines alternativen Ansatzes gegeben. Ein Ansatz zur Amplifikation dissektierter Chromosomensegmente, bei dem im Vergleich zur LA-PCR eine geringere Anzahl von Enzymen zum Einsatz kommt, ist die DOP-PCR. Mit Hilfe degenerierter Primer, die sich in einer Anzahl variabler Nukleotide unterscheiden, wird die Template-DNA unter unspezifischen Reaktionsbedingungen präamplifiziert, um dann im zweiten Reaktionsteil unter spezifischen Bedingungen vervielfältigt zu werden. Im Vergleich zur LA-PCR werden bei diesem Ansatz kein Restriktionsenzym, bzw. keine Ligase eingesetzt. Um die DOP-PCR hinsichtlich der angestrebten Verminderung, oder Ausschaltung von DNA-Amplifikationen zu bewerten, die auf Kontaminationen zurückzuführen sind, wurden Testreihen mit unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen an Mais-DNA durchgeführt. Als Grundlage hierzu diente das DOP-PCR Protokoll von TELENIUS *et al.* (1992).

Um die Empfindlichkeit in Bezug auf eine Amplifikation kleinster DNA-Mengen für einen möglichen Einsatz in der Amplifikation dissektierter Chromosomensegmente zu testen, wurden drei verschiedene Konzentrationen von Mais-DNA (1,5 pg; 150 fg; 15 fg), sowie eine Negativkontrolle (keine DNA) in einer DOP-PCR amplifiziert. Bei einer Anfangskonzentration von 1,5 pg Mais-DNA war ein Amplifikationsprodukt in der Agarosegelelektrophorese nachweisbar. Alle übrigen Konzentrationen, einschließlich der Negativkontrolle, führten zu keinem, im Gel sichtbaren Amplifikationsprodukt (Abbildung 10 A). Zur Erhöhung der Empfindlichkeit der Amplifikation kleinster DNA-Mengen wurde das Experiment mit erhöhter Zyklenzahl im zweiten Amplifikationsteil (spezifische Reaktionsbedingungen) wiederholt. Dies führte bei allen DNA-Konzentrationen zu einer Amplifikation. Jedoch war auch in der Negativkontrolle ein deutliches Amplifikationsprodukt im Agarosegel nachweisbar (nicht gezeigt).

Mit einer Anfangskonzentration von 1,5 pg DNA-Lösung wurde die Anzahl der Zyklen des stringenten Reaktionsteils variiert (30/35/40/45 Zyklen). Gleichzeitig wurde zu jeder Zyklenzahl eine entsprechende Negativkontrolle (ohne DNA) durchgeführt. Die Agarosegelelektrophorese zeigte bei allen Zyklenvarianten mit DNA-Zugabe ein Amplifikationsprodukt. Bei

den entsprechenden Negativkontrollen war ab einer Anzahl von 35 Zyklen ebenfalls eine DNA-Amplifikation nachweisbar (Abbildung 10 B).

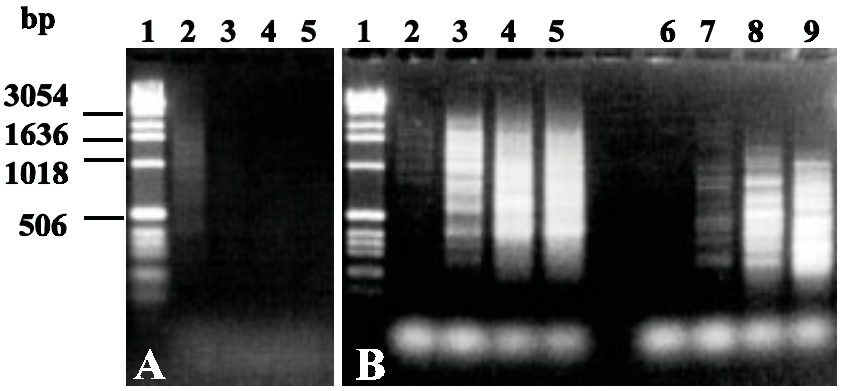


Abbildung 10: Amplifikationsprodukte der DOP-PCR

A) Amplifikation verschiedener Ausgangskonzentrationen genomischer Mais-DNA:
1) Längenmarker; 2) 1,5 pg DNA; 3) 150 fg DNA; 4) 15 fg DNA; 5) Negativkontrolle ohne DNA

B) Amplifikation von 1,5 pg DNA mit verschiedener Anzahl Zyklen im spezifischen Reaktionsteil (62°C *annealing*-Temperatur):
1) Längenmarker; 2-5) jeweils 1,5 pg DNA; 6-9) Negativkontrollen jeweils ohne DNA;
2 + 6) 30 Zyklen; 3 + 7) 35 Zyklen; 4 + 8) 40 Zyklen; 5 + 9) 45 Zyklen

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die verwendete *Taq*-Polymerase ebenfalls herstellerbedingt mit geringen Mengen an DNA verunreinigt war, die durch die unspezifischen Reaktionsbedingungen in Verbindung mit hoher Zyklenzahl zu einem Amplifikationsprodukt führte.

4.3. Mikroamplifikation mit optimiertem LA-PCR Protokoll

Die DNA-Quelle, die bei der LA-PCR zu einer Amplifikation in der Negativkontrolle führte, konnte als herstellerbedingte Verunreinigung der verwendeten Enzyme mit bakterieller DNA identifiziert werden. Durch Reduktion der Enzymkonzentration beim Restriktionsverdau und gleichzeitiger Verlängerung der Inkubationsdauer (auf 16 bis 17 Stunden) konnte verhindert werden, daß ein Amplifikationsprodukt in der Negativkontrolle entstand.

Nachdem die Mikroamplifikation bei der LA-PCR auf die Vermeidung der Amplifikation von DNA-Kontaminationen hin optimiert werden konnte, wurde dieses Protokoll zur Mikroamplifikation dissektierter Chromosomensegmenten aus dem Bereich des langen Arms von Chromosom 9 eingesetzt. Da bei Präparationen von Pachytänchromosomen die Ausbeute an geeigneten Präparaten, die eine Mikrodissektion von Chromosom 9 ermöglichte, gering war, wurde auf mitotische Metaphasechromosomen der *B-A* Translokationslinie TB-9Lc zurückgegriffen. In zwei unabhängigen Dissektionsexperimenten konnten 35 (Experiment *A*), bzw. 26 (Experiment *B*) *B-9* Translokationschromosomen isoliert werden. Zur Schaffung von genügend Freiraum für deren Isolierung mit Hilfe von Glasnadeln, wurden alle umliegenden Chromosomen mittels eines Lasermikrostrahls entfernt (Abbildung 11). Hierdurch sollte die Isolierung von angrenzendem Chromatin verhindert werden.

Zur Entfernung umliegender Chromosomensegmente mit dem N_2-Laser, sowie Mikrodissektion, Isolierung und Ablage der Chromosomensegmente im Sammeltropfen, wurde pro Translokationschromosom zwischen zehn und zwanzig Minuten benötigt. Deshalb wurde bei beiden Mikrodissektionsexperimenten die Dissektionsarbeit an jeweils zwei aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt. Am Ende des ersten Tages wurde das Deckglas mit den Sammeltropfen und den darin bereits abgelegten Segmenten in einer sterilen, mit Parafilm verschlossenen Feuchtekammer bei 4°C über Nacht gelagert.

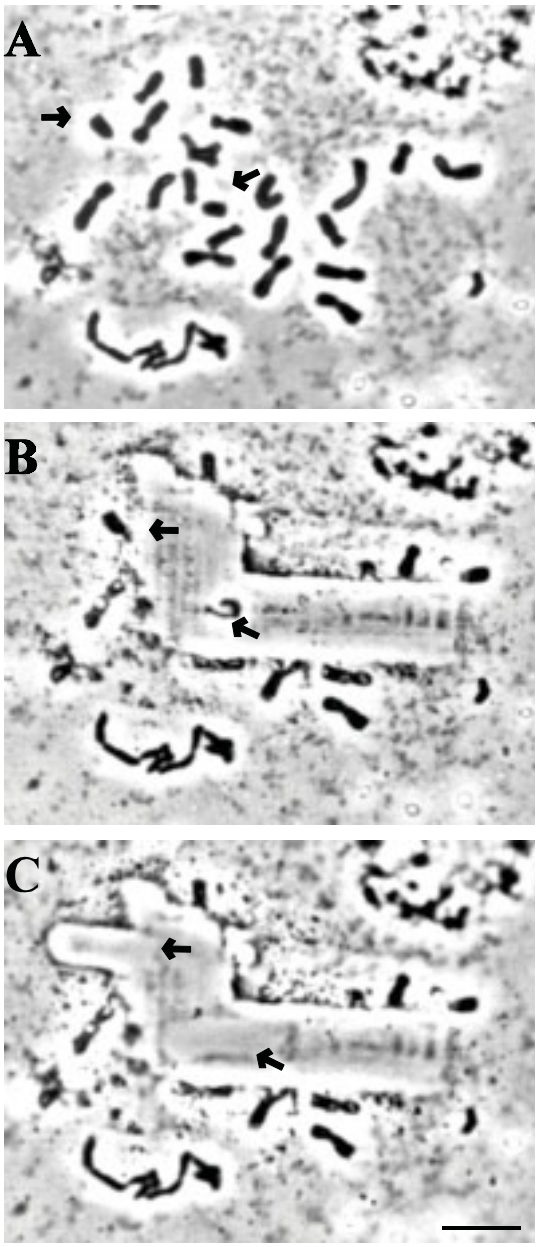


Abbildung 11:
Mikrodissektion von B-9 Translokationschromosomen der Linie TB-9Lc

A) Mitotische Metaphasechromosomen. Die beiden *B-9* Translokationschromosomen sind als telozentrische Chromosomen identifizierbar (Pfeile)

B) Um eine Isolierung der beiden *B-9* Translokationschromosomen (Pfeile) zu ermöglichen, wurden diese mit einem gepulsten Stickstofflaser von umliegenden Chromosomen befreit

C) Nach Isolierung der Translokationschromosomen mit der Glasnadel (Pfeile)
(Balken entspricht 10 μm)

Für den bei einer Mikroamplifikation dissektierter Chromosomensegmente notwendigen Proteinverdau wurde auf eine Proteinase K Lösung der Firma Merck zurückgegriffen. Diese enthielt, laut Herstellerangaben, eine DNA-Kontamination von maximal 1 pg DNA pro mg Protein. Nach einem jeweils dreistündigen Proteinase K Verdau wurde die DNA entsprechend der zuvor dargestellten Ergebnisse mit 0,01 U × μl^{-1} der Restriktionsendonuklease *MboI* verdaut. Die weitere Behandlung erfolgte nach PONELIES *et al.* (1997) und STEIN (1998). Da bei beiden Dissektionsexperimenten (*A* + *B*) die Mikroamplifikationen vergleichbare Produkte lieferten, ist das Ergebnis in Abbildung 12 A) exemplarisch für Experiment *A* dargestellt.

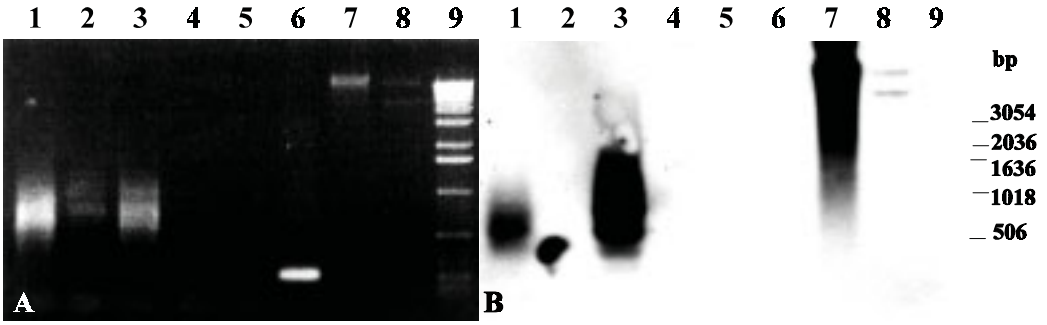


Abbildung 12: LA-PCR mit dissektierten B-9 Translokationschromosomen (Experiment *A*)
A) Gelelektrophorese der PCR-Produkte und **B)** Southern-Hybridisierung mit DIG-markierter Mais-DNA.
1) PCR-Produkt aus 35 dissektierten Translokationschromosomen; 2) Negativkontrolle I (Sammeltropfen ohne DNA); 3) Positivkontrolle I (1,5 pg DNA in LA-PCR); 4) Negativkontrolle II (keine DNA in Restriktionsverdau); 5) Negativkontrolle III (keine DNA in PCR-Reaktion); 6) Positivkontrolle II (Plasmidvektor mit Sequenzierprimer); 7) Positivkontrolle III (100 ng Mais-DNA); 8) Längenmarker (DIG-Marker III, Boehringer); 9) Längenmarker (1 kb Leiter)

Beide Dissektionsexperimente führten sowohl in Ansätzen mit dissektierten Chromosomensegmenten, als auch in der Positivkontrolle mit 1,5 pg Mais-DNA zu einem deutlichen Amplifikationsprodukt mit einer Größenverteilung von 200 bis etwa 1300 bp. Die Negativkontrolle I (keine DNA in Sammeltropfen) zeigte ein schwaches Amplifikationsprodukt. Zur ersten Analyse der LA-PCR erfolgte eine Southern-Hybridisierung mit DIG-markierter Mais-DNA (Abbildung 12 B). Diese führte zu einem deutlichen Hybridisierungssignale in Ansätzen mit isolierten Chromosomensegmenten (Spur 1) und mit Mais-DNA in der Positivkontrolle I (Spur 3), was die spezifische Amplifikation von Mais-DNA bestätigte.

4.4. Analyse und Klonierung der Mikroamplifikationsprodukte

Nachdem in einer Southern-Hybridisierung die spezifische Amplifikation von Mais-DNA nachgewiesen werden konnte, folgten Analysen zu Herkunft und Zusammensetzung der Amplifikationsprodukte.

4.4.1. Relokalisation mittels *CISS*-Hybridisierung

Eine Methode, die chromosomensegmentspezifische Herkunft der Amplifikationsprodukte zu bestätigen, ist die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH). Jedoch wird eine direkte Zuordnung von komplexen genomischen Sequenzen zu einem bestimmten Chromosomenbereich aufgrund repetitiver Sequenzanteile in der Sonde und im Genom schwierig, wenn diese nicht spezifisch für diesen Bereich, sondern über das gesamte Genom verteilt sind. Durch Bindung entsprechender repetitiver Sequenzen auf der Sonde mit unmarkierter DNA in einer Vorhybridisierung können unspezifische Fluoreszenzsignale unterdrückt (kompetiert) werden (´**c**hromosomal ***in situ*** **s**uppression´ (CISS) Hybridisierung). Zur Relokalisation der komplexen LA-PCR-Sonden wurde deshalb die *CISS*-Hybridisierung eingesetzt. Die Kompetition repetitiver Sequenzen erfolgte mit *DNAseI* behandelter genomischer Mais-DNA, oder mit C_0t-1 DNA, welche mit hoch- und mittelrepetitiven Sequenzen angereichert war.

Die LA-PCR-Produkte mikrodissektierter Segmente aus beiden Dissektionsexperimenten wurden in einer PCR-Reaktion mit Biotin markiert. Anschließend wurden die Sonden auf mitotische Metaphasechromosomen hybridisiert, um die segmentspezifische Herkunft des Ausgangsmaterials für die Mikroamplifikation zu überprüfen. Unter Einsatz unterschiedlicher Mengen *DNaseI* behandelter genomischer Mais-DNA als Kompetitor-DNA (0 µg; 2 µg; 4 µg; 8 µg; 16 µg pro Objektträger) führte das LA-PCR-Produkt aus Dissektionsexperiment *A* zu keinem spezifischen Hybridisierungssignal auf mitotischen Metaphasechromosomen der Linie KYS. Eine vollständige Unterdrückung unspezifischer repetitiver Sequenzen konnte mit 16 µg Kompetitior-DNA erreicht werden, jedoch waren hier keine Fluoreszenzsignale erkennbar, die eine spezifische Zuordnung erlaubten (nicht gezeigt).

Bei Wiederholung des Experimentes mit *DNAseI* behandelter genomischer DNA, oder C_0t-1 DNA als Kompetitor (je 0 µg, 8 µg und 16 µg) und einer Hybridisierung auf mitotische Metaphasechromosomen der Translokationslinie TB-9Lc, zeigten die biotinmarkierten LA-PCR-Produkte beider Dissektionsexperimente (*A* + *B*) vergleichbare Hybridisierungsmuster. Ohne Kompetition repetitiver Sequenzanteile der Sonde war das Fluoreszenzsignal über das gesamte Genom verteilt. Lediglich die nukleolusorganisierende Region (NOR) von Chromosom 6 zeigte keine Hybridisierung (Abbildung 13 A). Bei Kompetition mit 8 und 16 µg DNA zeigte sich bei beiden LA-PCR-Produkten ein intensives Signal in der B-Zentromerregion der *B-9* Translokationschromosomen. (Abbildung 13 B). Es waren keine spezifischen Fluoreszenzsignale im Bereich des langen Arms von Chromosom 9, oder eines anderen Genombereiches erkennbar. Eine Hybridisierung der Sonden aus den Mikroamplifikationen A und B auf eine B-Chromosomen haltige BMSC-Linie zeigte bei allen B-Chromosomen ebenfalls eine Hybridisierung in der Zentromerregion (Abbildung 13 C).

Da bei der Mikrodissektion jeweils die gesamten B-9 Translokationschromosomen isoliert wurden, enthielten die LA-PCR-Produkte u.a. B-zentromerspezifische Sequenzen, die bei einer Kompetition mit Kompetitor-DNA aus dem A-Genom in einer *CISS*-Hybridisierung nicht unterdrückt werden. Aufgrund der spezifischen Hybridisierung dieser Sequenzanteile mit der B-Zentromerregion von *B-9* Translokationschromosomen konnte indirekt bestätigt werden, daß die Mikroamplifikationsprodukte aus den Translokationschromosomen hervorgingen, die u.a. den langen Arm von Chromosom 9 repräsentieren.

Der Vergleich der Hybridisierungen unter Verwendung von je 8 und 16 µg *DNaseI* behandelter genomischer DNA oder C_0t-1 DNA als Kompetitor zeigte kein Unterschied in der Kompetitionseignung.

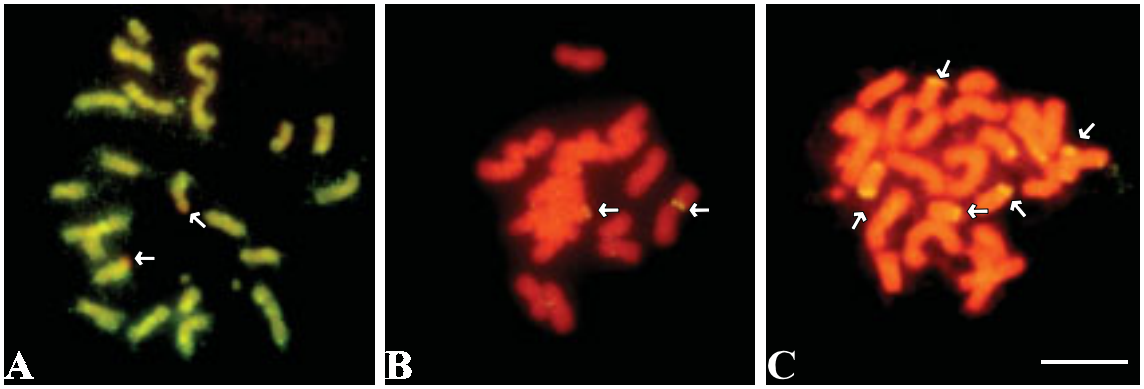


Abbildung 13: Relokalisation des biotinmarkierten Mikroamplifikationsproduktes aus der LA-PCR von *B-9* Translokationschromosomen mittels *CISS*-Hybridisierung (Dissektionsexperiment *A*)

A) Hybridisierung auf TB-9Lc; ohne Kompetition:
Mit Ausnahme der NOR von Chromosom 6 (Pfeil) - die Satelliten sind bei der Präparation abgerissen - erstreckt sich das Hybridisierungssignal auf den gesamten Genombereich

B) Hybridisierung auf TB-9Lc; Kompetition mit 8 µg C_0t-1 DNA:
Ein deutliches Fluoreszenzsignal ist im B-Zentromerbereich der *B-9* Translokationschromosomen erkennbar (Pfeil)

C) Hybridisierung auf BMSC; Kompetition mit 8 µg C_0t-1 DNA:
Die Zentromerbereiche der B-Chromosomomen zeigen deutliche Fluoreszenzsignale (Pfeil). (Balken entspricht 10 µm)

4.4.2. Klonierung von LA-PCR Produkten

Die Mikroamplifikation von Chromosomensegmenten erfolgte mit dem Ziel der Erzeugung segmentspezifischer DNA-Sonden zur besseren Charakterisierung der QTL für Zünslerresistenz auf dem langen Arm von Chromosom 9. Hierzu wurden die LA-PCR Produkte aufgereinigt, kloniert und in kompetente Bakterienzellen transformiert.

4.4.2.1. Transformation der LA-PCR Produkte zu segmentspezifischen DNA-Bibliotheken

Zur Transformation der in *pBluescript*-Vektor klonierten LA-PCR-Produkte wurden *Escherichia Coli* MaxEfficiency™ DH5α eingesetzt, mit denen (laut Herstellerangaben) eine Transformationseffizienz von 1×10^9 CFU x μg^{-1} pUC19-Vektor erzielt werden kann. Die ermittelte Effizienz der Kontrolltransformation mit pUC19 betrug bei Transformation von LA-PCR-Produkten aus Dissektionsexperiment *A* $6{,}8 \times 10^8$, bei Experiment *B* $4{,}5 \times 10^8$ CFU × μg^{-1} pUC19-Vektor. Aufgrund der nur groben Konzentrationsabschätzung der aufgereinigten LA-PCR-Produkte mittels Agarosegel wurde die Transformationseffizienz der DNA-Bibliotheken auf jeweils 100 µl PCR-Produkt bezogen. Diese Angabe beschrieb die maximal erreichbare Anzahl rekombinanter Klone bei Transformation der gesamten LA-PCR-Produkte. Die Transformationseffizienz in der Bibliothek aus Dissektionsexperiment *A* betrug $7{,}6 \times 10^6$, der Bibliothek aus Dissektionsexperiment *B* $2{,}1 \times 10^7$ rekombinante Klone pro 100 µl LA-PCR Produkt (Tabelle 3). Die aus dem Mikrodissektionsexperiment *A* resultierende segmentspezifische DNA-Bibliothek wurde fortan mit der Bezeichnung TB9L-A geführt. Entsprechend hierzu erhielt die DNA-Bibliothek aus dem Mikrodissektionsexperiment *B* die Bezeichnung TB9L-B.

4.4.2.2. Analyse der segmentspezifischen DNA-Bibliotheken

Für den erfolgreichen Einsatz einzelner Klone aus den segmentspezifischen DNA-Bibliotheken als DNA-Sonden in Kartierungsstudien können nur solche Verwendung finden, die keine hoch- bis mittelrepetitiven Sequenzen enthalten. Um diesen Anteil aus einer unbekannten Bibliothek zu identifizieren und auszusondern, ist die Koloniehybridisierung mit genomischer DNA geeignet.

Von beiden segmentspezifischen DNA-Bibliotheken (TB9L-A und TB9L-B) wurde aus einer Stichprobe von je 460 rekombinanten Klonen Koloniefilter hergestellt und eine Koloniehybridisierung mit radioaktiv markierter genomischer Mais-DNA der Linie KYS durchgeführt. In Abbildung 14 ist exemplarisch ein Ausschnitt aus dem Autoradiogramm von Koloniefiltern der Bibliothek TB9L-A zu sehen. Hierbei zeigten Klone mit hochrepetitiven Sequenzen starke, mit mittelrepetitiven Sequenzen schwache und mit wenig- bis nichtrepetitiven Sequenzen keine Hybridisierungssignale.

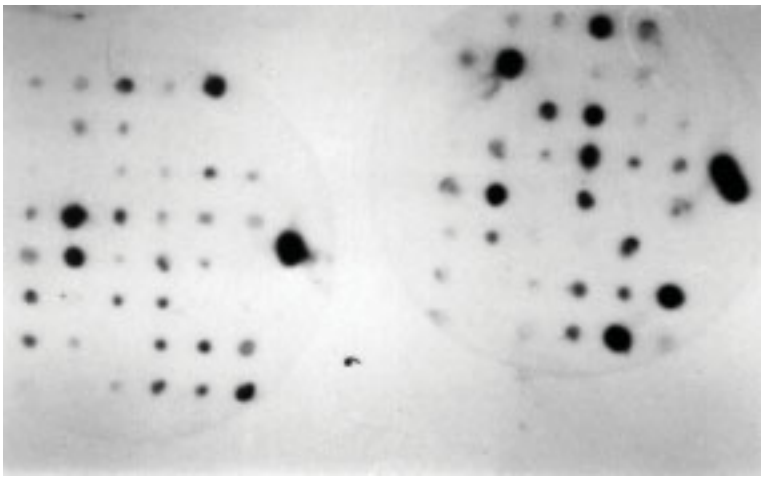


Abbildung 14: Ausschnitt aus der Koloniehybridisierung rekombinanter Klone der Bibliothek TB9L-A mit radioaktiv markierter genomischer Mais-DNA der Linie KYS

Kolonien mit hochrepetitiven DNA-Insertionen zeigen ein starkes, mit mittelrepetitiven DNA-Insertionen ein mittleres bis schwaches Hybridisierungssignal. DNA-Insertionen mit wenig- bis nichtrepetitiven Sequenzen führen zu keinem Hybridisierungssignal

Die Bibliothek TB9L-A hatte ein Anteil von 86%, Bibliothek TB9L-B von 85,4% Klone mit hoch- bis mittelrepetitiven DNA-Insertionen (Tabelle 3). Von den übrigen 14, bzw. 14,6% der Klone wurde Plasmid-DNA isoliert und eine Restriktionsanalyse zur Größenbestimmung der DNA-Insertionen durchgeführt. Rekombinante Klone der beiden Bibliotheken trugen DNA-Insertionen einer Länge zwischen 200 und 1000 bp, bei einer durchschnittlichen Länge von 400 bp (Abbildung 15; Tabelle 3).

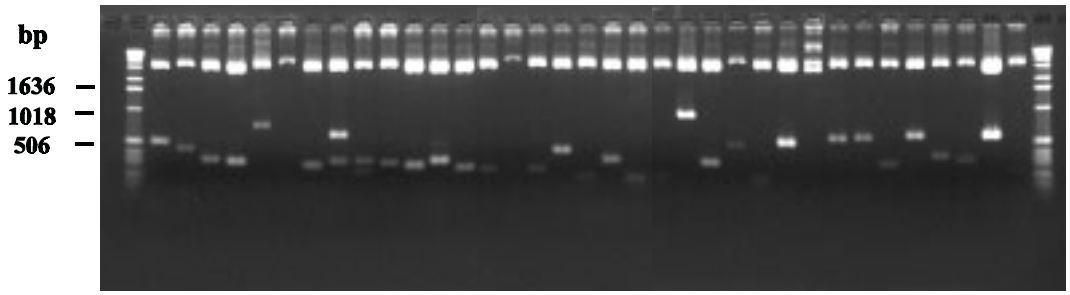


Abbildung 15: Restriktionsanalyse rekombinanter Klone der Bibliothek TB9L-A

Die durchschnittliche Insertionsgröße betrug 400 bp (erste und letzte Spur: Längenmarker)

4.4.2.3. Bestimmung des Anteils B-chromosomenspezifischer Sequenzen in den Bibliotheken

Bei Mikrodissektionsexperimenten mit Translokationschromosomen wurden diese jeweils komplett, inklusive der B-Zentromerregion, isoliert. Es war davon auszugehen, daß resultierende segmentspezifische DNA-Bibliotheken neben Sequenzen des langen Arms von Chromosom 9 auch B-Chromosomen spezifische Sequenzen enthalten würden. Zur Bestimmung des Anteils solcher Klone in beiden Bibliotheken wurde eine Koloniehybridisierung mit radioaktiv markierter Mais-DNA einer B-Chromosomen enthaltenden BMSC-Linie durchgeführt.

Im Vergleich mit Ergebnissen aus der Koloniehybridisierung mit Mais-DNA eines Genotyps ohne B-Chromosomen konnten geringe Unterschiede festgestellt werden. Bei den 460 untersuchten TB9L-A Kolonien waren fünf Kolonien (1,1%), bei den TB9L-B Kolonien war eine Kolonie (0,2%) mit qualitativen Unterschieden im Hybridisierungssignal festzustellen (nicht gezeigt).

Ein durch die differentielle Koloniehybridisierung als potentiell B-spezifisch identifizierter Klon wurde nach Biotinmarkierung in einer FISH ohne Kompetition auf mitotische Metaphasechromosomen der *B-A* Translokationslinie TB-9Lc eingesetzt. Hierbei zeigte sich ausschließlich in der B-Zentromerregion der B-9 Translokationschromosomen eine deutliche Markierung (nicht gezeigt - vergleichbar mit Abbildung 13 B). Eine weitere Analyse dieser B-spezifischen Klone wird im Labor von D.F. Weber, Illinois State University, USA, vorgenommen.

4.4.3. Southern-Hybridisierungen vorselektierter Klone

Klone der Bibliotheken TB9L-A und TB9L-B, die in den Koloniehybridisierungen (Kapitel 4.4.2.2 und 4.4.2.3) kein Signal zeigten, waren als potentielle Wenig-, Einzelkopieklone anzusehen. Um deren tatsächliche Kopienzahl im Maisgenom zu bestimmen, und um die Existenz von Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFPLs) zu prüfen, wurden Southern-Hybridisierungen durchgeführt.

41 durch Koloniehybridisierung vorselektierte Klone der Bibliothek TB9L-A wurden als Sonde in einer Southern-Hybridisierung auf Blots mit DNA zehn verschiedener Mais-inzuchtlinien, geschnitten mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen, eingesetzt. Alle Klone zeigten eine spezifische Hybridisierung mit Mais-DNA. Darüber hinaus war bei 20 von 41 Klonen (48,8%) ein Polymorphismus zwischen den, mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *HindIII* geschnittenen, DNAs von jeweils zehn verschiedenen Linien erkennbar. Zudem wurde ein rekombinanter Einzelkopieklon identifiziert (Klon #14; Abbildung 16; Tabelle 3). Zwar zeigten alle getesteten Klone in der Koloniehybridisierung kein Signal, jedoch ergaben 33 Klone (80,5%) eine mehr oder weniger deutliche Hintergrund-hybridisierung über den gesamten Größenbereich hinweg.

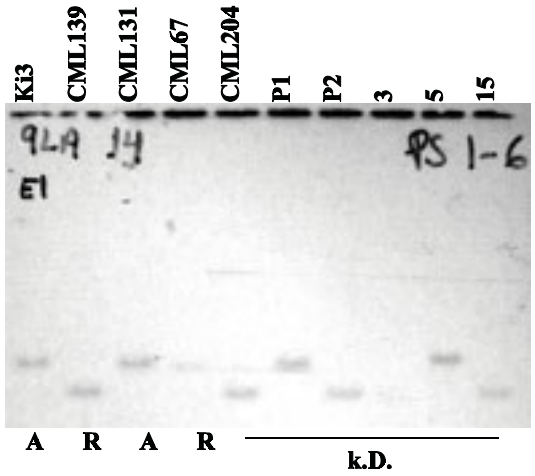


Abbildung 16: Polymorphismus des Einzelkopieklons (Klon #14) der Bibliothek TB9L-A zwischen zehn unterschiedlichen Linien (DNA mit *EcoRI* geschnitten)
A = anfällig gegenüber SWCB und SCB; R = resistent gegenüber SWCB und SCB;
k.D. = keine Daten verfügbar bezüglich Resistenzverhalten gegenüber SWCB und SCB

Der identifizierte polymorphe Einzelkopieklon aus der Bibliothek TB9L-A wurde zur genetischen Kartierung am CIMMYT, Mexico, eingesetzt. Es erfolgte eine Hybridisierung auf Testfilter mit DNA von Maisgenotypen der Population Ac7729 x CML247, geschnitten mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *HindIII*. Die Auswertung ergab einen kodominanten Polymorphismus mit *EcoRI* geschnittener DNA, sowie einen kodominanten und dominanten Polymorphismus mit *HindIII* geschnittener DNA. Die Analyse der Aufspaltung der zwei kodominanten Polymorphismen identifizierte den gleichen Locus. Der dominante Locus kartierte auf Chromosom 3, zwischen den flankierenden Markern *csu154* und *bnl10.24*, wohingegen der kodominante Locus auf Chromosom 8, zwischen *umc138* und *umc16*, kartierte (Abbildung 17).

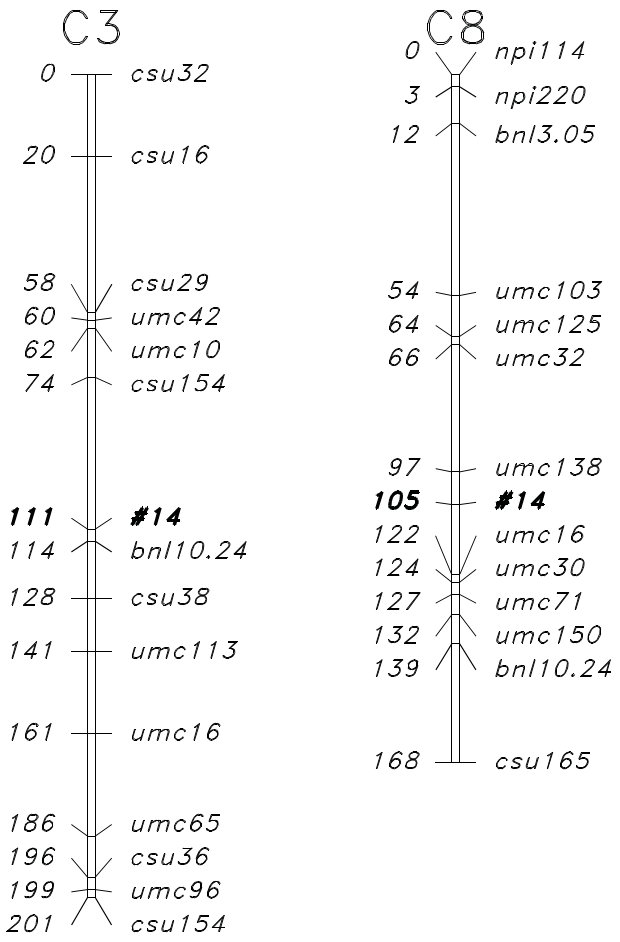


Abbildung 17: Genetische Kartierung von Klon #14 in der Kartierungspopulation Ac7729 × CML247
Auf Chromosom 3 (C3) kartiert der Klon (#14) zwischen *csu154* und *bnl10.24*, auf Chromosom 8 (C8) zwischen *umc138* und *umc16;* (Die genetischen Distanzen [cM] stehen jeweils links, die Bezeichnung der molekularen Marker jeweils rechts; der kurze Chromosomenarm ist nach oben ausgerichtet).

Tabelle 3: Charakterisierung rekombinanter Klone aus DNA-Bibliotheken der Mikroamplifikationen

A: Dissektionsexperiment A - Kapitel 4.3 (mit Linie TB-9Lc)

B: Dissektionsexperiment B - Kapitel 4.3 (mit Linie TB-9Lc)

C: Dissektionsexperiment - Kapitel 4.2.1 (mit Linie KYS)

	A	B	C
Anzahl dissektierter Segmente	35[1)]	26[1)]	10[2)]
Größenbereich des LA-PCR-Produktes [bp]	200-1300	200-1300	200-1600
Kontrolltransformation (1 µg pUC-Vektor[3)4)])	$6{,}8 \times 10^8$	$4{,}5 \times 10^8$	$6{,}7 \times 10^8$
Transformationseffizienz[5)]	$7{,}6 \times 10^6$	$2{,}1 \times 10^7$	$2{,}8 \times 10^5$
Anzahl analysierter rekombinanter Klone	460	460	250
Größenbereich der DNA-Insertionen [bp]	200-1000	200-1000	200-800
Durchschnittliche Insertgröße [bp]	400	400	460
Anteil Klone mit repetitiven Sequenzen[6)]	86,0%	85,4%	0,4%
Anteil Klone mit B-Chromosomen Sequenzen[7)]	5 (1,1%)	1 (0,2%)	--
Anzahl analysierter Wenig-, Einzelkopieklone[8)]	41	n.u.	52
davon polymorph	20 (48,8%)	n.u.	n.u.
Einzelkopieklone	1 (2,4%)	n.u.	n.u.
Keine Hybridisierung mit Mais-DNA	0 (0%)[9)]	n.u.	6 (11,8%)[10)]

1) *B-9* Translokationschromosomen der Linie TB-9Lc; 2) Pachytänchromosomensegmente der Linie KYS; 3) Lt. Herstellerangaben sind 1×10^9 CFU möglich; 4) A + B: pUC19-Vektor, C: pUC18-Vektor; 5) Anzahl rekombinanter Klone pro 100 µl LA-PCR-Produkt; 6) Ermittelt durch Koloniehybridisierung mit genomischer Mais-DNA der Linie CML139; 7) Ermittelt durch Koloniehybridisierung mit genomischer Mais-DNA einer B-Chromosomen enthaltenden BMSC-Linie; 8) Klone, die in der Koloniehybridisierung mit genomischer Mais-DNA kein Signal zeigten; 9) aus einer Stichprobe von 41 getesteten Klonen in einer Southern-Hybridisierung; 10) aus einer Stichprobe von 51 isolierten DNA-Insertionen; n.u. = nicht untersucht.

4.5. Physikalische Kartierung molekularer Marker

Die Mikrodissektion von Chromosomen wurde mit dem Ziel verfolgt, neue molekulare Marker im Bereich der Zünslerresistenzgene bei Mais zu entwickeln. Ein weiteres Ziel der Mikrodissektion war die Identifikation physikalischer Positionen molekularer Marker. Diese sind für die Entwicklung einer physikalischen Karte eines Chromosoms notwendig, die beispielsweise zur Klonierung von Genen entsprechende Referenzpunkte zur Verfügung stellt. Weiterhin können mit folgenden Methoden physikalische Distanzen zwischen molekularen Markern ermittelt werden: **i)** Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH), **ii)** Pulsfeldgelelektrophorese, **iii)** *Radiation-hybrid-lines* (Herstellung von Hybriden mit Fragmenten aus dem Zielgenom).

Zur physikalischen Kartierung molekularer RFLP-Sonden aus dem Bereich der QTL für Zünslerresistenz, sowie der aus Mikrodissektion gewonnenen Sonden wurde die FISH eingesetzt. Mit dieser Technik gestaltet sich eine direkte Detektion kleiner (< 1000 bp) Einzelkopiesonden bei Pflanzen schwierig. Da die Fragmentgrößen der Sonden (Klone aus der Mikroamplifikation, bzw. RFLP-Sonden) im Durchschnitt nur etwa 400 - 500 bp umfassen, ist deshalb eine Detektion mit größeren Sonden, die homolog zu ersteren sind, notwendig. Mit Hilfe einer Cosmidbibliothek aus Mais (J. MESSING, Rutgers University, New York) war es möglich, Cosmidklone mit Sequenzhomologien zu den entsprechenden molekularen Sonden zu isolieren.

4.5.1. Isolierung spezifischer Cosmidklone

Zur physikalischen Kartierung der für Zünslerresistenz auf Chromosom 9 kartierten QTL-Bereiche, wurden relevante RFLP-Sonden (*p-csu93*, *p-csu145*, *p-umc105*, *p-csu147*, *p-csu56*) zur Isolierung homologer Cosmidklone aus der Cosmidbibliothek eingesetzt. Für die RFLP-Sonden *p-csu93, p-csu145, p-csu56* und *p-umc105* konnten Cosmidklone isoliert werden. Die Sonde *p-csu147* zeigte keine Homologie zur Cosmidbibliothek.

Um die molekularen Sonden aus der Mikrodissektion in Relation zu den genetisch kartierten RFLP-Sonden physikalisch zu positionieren, wurden neben dem Einzelkopieklon (Klon #14), drei in der Southern-Analyse als Wenigkopieklone detektierte Sonden (Klone #5, #34 und

#45) der Bibliothek TB9L-A zur Suche nach homologen Cosmidklonen mit der Cosmidbibliothek hybridisiert. Für den Einzelkopieklon #14 konnte kein Cosmidklon mit Sequenzhomologie isoliert werden, wohl aber für die drei Wenigkopieklone #5, #34 und #45.

4.5.2. *CISS*-Hybridisierung von Cosmidklonen

Aufgrund der Größe der DNA-Insertionen ist bei Cosmidklonen mit dem Vorhandensein repetitiver Sequenzen zu rechnen. Deshalb ist bei deren Verwendung als Sonde in der *in situ* Hybridisierung eine Kompetition mit unmarkierter DNA erforderlich, um Fluoreszenzsignale aufgrund repetitiver Sequenzanteile zu unterdrücken.

Eine Hybridisierung mit *umc105*-Cosmid (*umc105-cos*) zeigte bei Kompetition mit 4 µg C_0t-1 DNA ein deutliches Signal am telomeren Ende des kurzen Arms von Chromosom 9 und des *9-B* Translokationschromosoms der Linie TB9-Lc (Abbildung 18 B). Bei einer Hybridisierung dieser Sonde mit Metaphasechromosomen der *B-A* Translokationslinie TB9-Lb waren bis zu drei Hybridisierungssignale als jeweils zwei diskrete, gegenüberliegende Fluoreszenzsignale erkennbar. Diese lagen am telomeren Ende des translozierten kurzen Arms von Chromosom 9 der beiden *B-9* Translokationschromosomen und des Chromosoms 9 (Abbildung 18 C). Die Hybridisierung mit Metaphasechromosomen der Linie KYS zeigte bis zu einer Kompetition mit 12 µg C_0t-1 DNA deutliche Hybridisierungssignale an den telomeren Enden des kurzen Arms von Chromosom 9 (Abbildung 18 A). Bei einer Doppelhybridisierung mit der maiszentromerspezifischen Sonde *´Cent C´* (R.L. PHILLIPS, University of Minnesota, St. Paul, USA) konnte die Lage des molekularen Markers *umc105* relativ zum Zentromer dargestellt werden (Abbildung 18 G+H). Insgesamt war das Fluoreszenzsignal in etwa 80% der untersuchten Metaphasen sichtbar.

Die Hybridisierungen mit *csu145*-Cosmid (*csu145-cos*) und *csu93*-Cosmid (*csu93-cos*) erzeugten bei Kompetition mit je 2 µg C_0t-1 DNA ein Hybridisierungssignal im Telomerbereich des translozierten langen Arms von Chromosom 9 auf dem *B-9* Translokationschromosom der Linie TB9-Lc. Dieses war bei jeweils etwa 20% der untersuchten Metaphasen in Form von zwei diskreten, gegenüberliegenden Fluoreszenzsignalen auf einem oder beiden *B-9* Translokationschromosomen, oder auf Chromosom 9 erkennbar (Abbildung 18 D + E). Eine Hybridisierung mit *csu145-cos* auf Chromosomen der Linie TB9-Lc verhinderte bei Kompetition mit unmarkierter Sonden-DNA (*csu145-cos*) *in situ* Hybridisierung (Abbildung

18 F). Das Resultat bestätigte die Spezifität der Fluoreszenzsignale in der vorausgegangenen *CISS*-Hybridisierung mit *csu145-cos*. Mit *csu56*-Cosmid (*csu56-cos*) wurde kein spezifisches Fluoreszenzsignal beobachtet, das eine Lokalisierung der Sonde im Genom ermöglicht hätte.

Abbildung 18: ***CISS*-Hybridisierung von biotinmarkierten Einzelcosmidklonen, spezifisch für entsprechende RFLP-Sonden, auf mitotische Metaphasechromosomen unterschiedlicher Genotypen von Mais**

(Abbildung siehe Seite 62)

A) *umc105-cos*, hybridisiert auf KYS; spezifisches Hybridisierungssignal am telomeren Ende des kurzen Arms von Chromosom 9

B) *umc105-cos*, hybridisiert auf *B-A* Translokation TB-9Lc; spezifisches Hybridisierungssignal am telomeren Ende des kurzen Arms von Chromosom 9, sowie am telomeren Ende des kurzen Arms von Chromosom 9 des *9-B* Translokationschromosoms (diese beiden Chromosomen sind morphologisch nicht unterscheidbar)

C) *umc105-cos*, hybridisiert auf *B-A* Translokation TB-9Lb; spezifische Hybridisierung auf dem kurzen Arm von Chromosom 9 (Pfeilkopf) und den beiden *B-9* Translokationschromosomen (Pfeile)

D) *csu93-cos*, hybridisiert auf *B-A* Translokation TB-9Lc; schwaches, spezifisches Hybridisierungssignal am telomeren Ende der beiden *B-9* Translokationschromosomen.

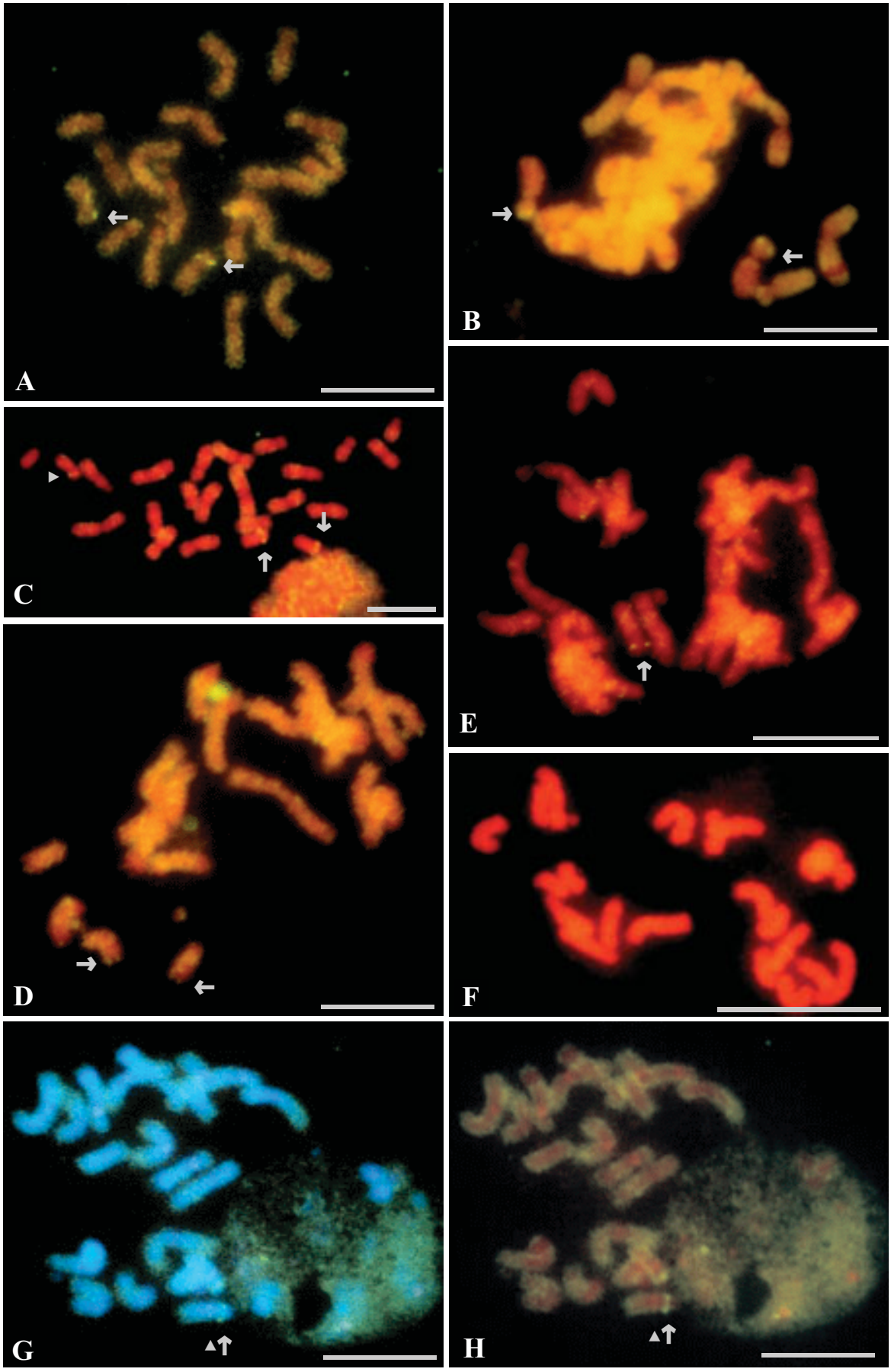
E) *csu145-cos*, hybridisiert auf *B-A* Translokation TB9-Lc; deutliches Hybridisierungssignal am telomeren Ende eines *B-9* Translokationschromosoms

F) *csu145-cos*, spezifische Inhibierung der Hybridisierung auf *B-A*-Translokation TB9-Lc; Kompetition mit unmarkierter *csu145-cos* Sonde. Keine spezifischen Hybridisierungssignale erkennbar

G) Doppelhybridisierung *umc105-cos* (Pfeil) und der DIG-markierten, maiszentromerspezifischen Sonde *´CentC´* (Pfeilkopf) auf mitotische Metaphasechromosomen der Linie KYS. Hintergrundfärbung mit DAPI-Epifluoreszenz

H) Wie "G", jedoch mit Propidiumjodid als Hintergrundfärbung

(Balken entspricht 10 µm)


A
B
C
D
E
F
G
H

Die drei mit Sonden aus der Mikrodissektionsbibliothek TB9L-A (Klone #5, #34 und #45) identifizierten Cosmidklone wurden zur Hybridisierung mit Metaphasechromosomen der Linien TB-9Lc und KYS eingesetzt. Mit steigender DNA-Konzentration des Kompetitors war eine Abnahme der Intensität der Fluoreszenzsignale aufgrund unspezifischer repetitiver Sequenzen - bis hin zu einer vollständigen Auslöschung - zu beobachten. Spezifische Signale, die eine Lokalisierung der Sonden auf den Chromosomen ermöglicht hätten, waren nicht zu erkennen (Abbildung 19).

Abbildung 19: ***CISS*-Hybridisierung des biotinmarkierten Cosmidklons 10.35-cos, spezifisch für Klon #45 aus der segmentspezifischen DNA-Bibliothek TB9L-A, auf Metaphasechromosomen der Linie KYS;** Kompetition mit unterschiedlichen Mengen an C_0t-1 DNA (Abbildung siehe Seite 64)

Mit zunehmender Konzentration an Kompetitor-DNA nimmt die Intensität der Fluoreszenzsignale aufgrund unspezifischer repetitiver Sequenzen ab. Es sind keine spezifischen Hybridisierungssignale erkennbar, die eine physikalische Lokalisation der Sonde ermöglichen würden.

A) Kompetition mit 2 µg Kompetitor-DNA

B) Kompetition mit 4 µg Kompetitor-DNA

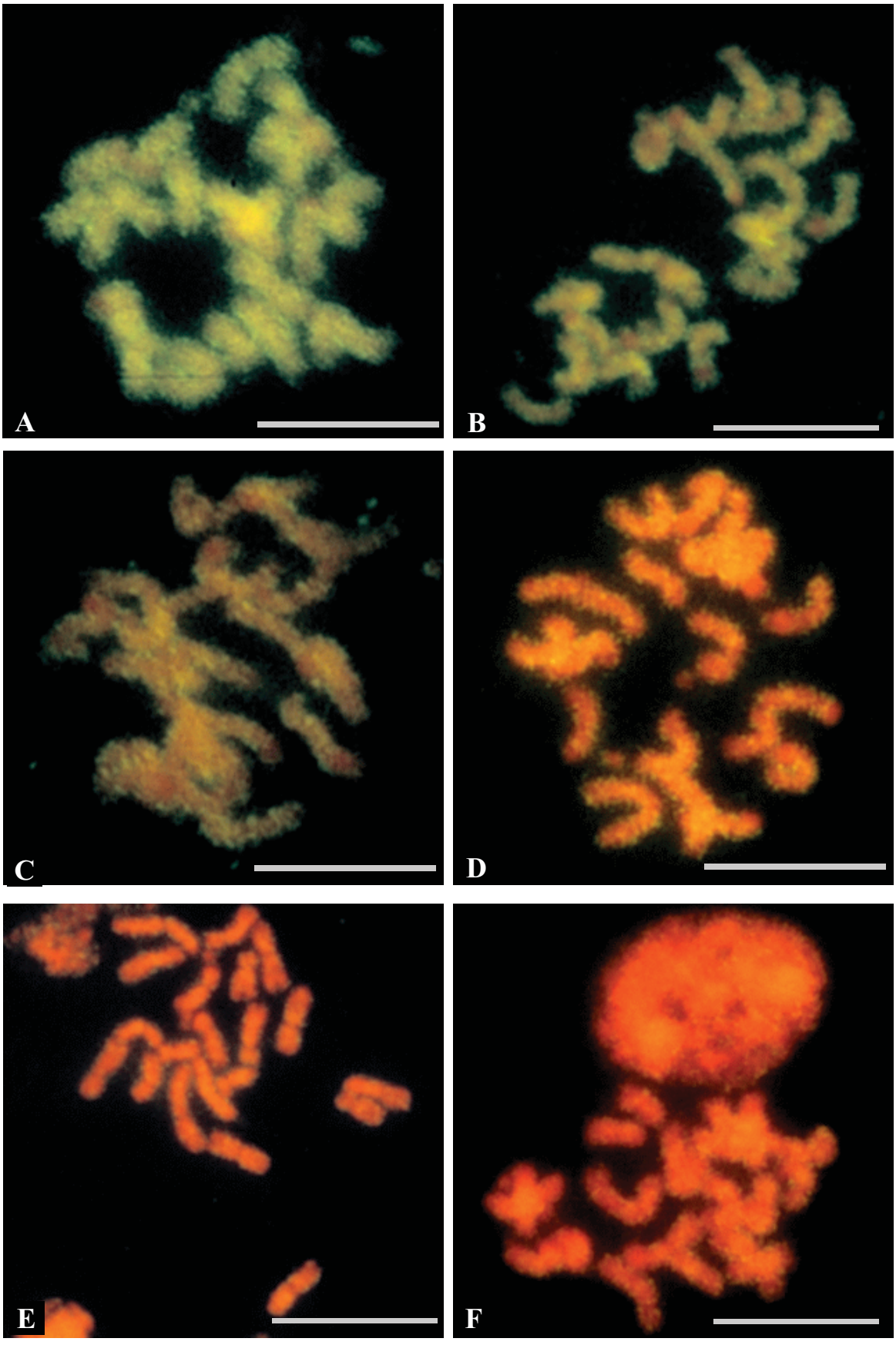
C) Kompetition mit 6 µg Kompetitor-DNA

D) Kompetition mit 8 µg Kompetitor-DNA

E) Kompetition mit 10 µg Kompetitor-DNA

F) Kompetition mit 12 µg Kompetitor-DNA

(Balken entspricht 10 µm)


A
B
C
D
E
F

4.5.3. Vergleich zwischen genetischer Distanz und physikalischer Position molekularer Marker auf Chromosomen

Das Ziel der *CISS*-Hybridisierung war die Identifikation physikalischer Positionen molekularer Marker auf Chromosomen zur Entwicklung einer physikalischen Karte. Unter Verwendung von Cosmidklonen, die mit Hilfe molekularer Sonden aus einer Cosmidbibliothek isoliert wurden, erfolgte eine Hybridisierung auf Metaphasechromosomen verschiedener Maislinien, unter Einsatz unterschiedlicher Kompetitor-DNA Konzentrationen.

Es war möglich, mit den Cosmidklonen *umc105-cos*, *csu145-cos* und *csu93-cos* spezifische Hybridisierungssignale zu erzeugen, die deren physikalische Lokalisation auf Chromosom 9 erlaubten. Ein Vergleich der physikalischen Karte von Chromosom 9 mit entsprechenden genetischen Karten zeigte Unterschiede in der Distanz zwischen molekularen Sonden. Der Cosmidklon *csu105-cos* konnte physikalisch im äußeren Drittel des kurzen Arms von Chromosom 9 positioniert werden. Die Cosmidklone *csu145-cos* und *csu93-cos* besaßen Hybridisierungspositionen am telomeren Ende des langen Arms von Chromosom 9. Eine auf der genetischen Karte basierende Distanz zwischen beiden Sonden konnte durch Hybridisierung auf mitotischen Metaphasechromosomen physikalisch nicht aufgelöst werden. Das Intervall der QTL-flankierenden Marker *umc105a* zu *csu93a/csu145* umfaßt auf der physikalischen Karte 80% der Länge von Chromosom 9. Die entsprechende Distanz auf der genetischen Karte war in Abhängigkeit der jeweils zugrundeliegenden Kartierungspopulation zu betrachten.

Auf der genetischen Karte von Chromosom 9 der University of Missouri in Columbia (UMC, 1998), die für Kartierungspopulation Tx303 × CO159 erstellt (Population A - Abbildung 20), beschreibt das Intervall zwischen *umc105a* (Position 54 cM) und *csu145a* (Position 105 cM) eine genetische Distanz von 51 cM. Dies entspricht einem Anteil von insgesamt 34% der genetischen Länge des Chromosoms. Da in der genetischen Karte die Position des Zentromers bei 67 cM, zwischen den molekularen Markern *wx1* und *umc153,* angegeben wird, beträgt die Distanz zwischen *umc105a* und dem Zentromer 13 cM, oder 9% der Gesamtlänge des Chromosoms. Das entsprechende Intervall auf der physikalischen Karte umfaßt 2/3 des kurzen Chromosomenarms. Bei einem DNA-Gehalt des Chromosom 9S von 77 Mbp (BENNETT UND LAURIE, 1995) ließ sich ein Verhältnis von 4 Mbp × cM^{-1} ermitteln. Für die Distanz zwischen *umc105a* und dem telomeren Ende von Chromosom 9S ergab sich ein Ver-

hältnis von 0,46 Mbp × cM^{-1}. Im distalen Bereich des langen Arms von Chromosom 9 errechnete sich eine Verhältnis von 0,29 Mbp × cM^{-1}, für den proximalen Bereich von 2,66 Mbp × cM^{-1}.

In den Kreuzungen CML131 × CML67 (Population B - Abbildung 19) und Ki3 × CML139 (Population C -Abbildung 20) wurden die QTL für Resistenz gegen *Diatraea spp.* kartiert (BOHN, 1998). Während in der Population B nur die Marker *umc105a* und *csu93a* kartiert waren, nicht jedoch *csu145*, enthielt die Karte der Population C nicht den Marker *umc105a*, dafür *csu93a* und *csu145*. Die genetische Distanz zwischen *umc105a* und *csu93a* umfaßte bei Population B 65 cM (57% der genetischen Länge), einem Verhältnis von 2,35 Mbp × cM^{-1} entsprechend. Vom telomeren Ende des kurzen Chromosomenarms kartierte *umc105a* bei 40 cM. Hieraus ergab sich ein Verhältnis von 0,62 Mbp × cM^{-1}. Zwischen *csu93a* und dem telomeren Ende von Chromosom 9L ließ sich ein Verhältnis zwischen physikalischer und genetischer Distanz von 1,44 Mbp × cM^{-1} ermitteln. Für das gleiche Intervall ergab sich für Population C ein Verhältnis von 0,27 Mbp × cM^{-1}. Da eine Auflösung der Distanz zwischen *csu145a* und *csu93a* auf der physikalischen Karte nicht möglich war, ließ sich für dieses Intervall keine Angabe zu dem Verhältnis zwischen physikalischer und genetischer Distanz machen. Eine Übersicht über den Vergleich zwischen den Kartierungspunkten auf den genetischen und der physikalischen Karte ist der Abbildung 20 zu entnehmen.

Abbildung 20: Verhältnis zwischen genetischer und physikalischer Distanz molekularer Marker in Abhängigkeit von der Kartierungspopulation und Chromosomenregion

(Abbildung siehe Seite 67)

Die Positionen der molekularen Marker *umc105a*, *csu145a* und *csu93a* auf der physikalischen Karte, wurde mit den entsprechenden Positionen der genetischen Karte von Chromosom 9 aus drei verschiedenen Populationen verglichen. (■ Markierung der Zentromerregion auf der genetischen Karte der Population A; ● Markierung der physikalischen Position der molekularen Marker)

Population A: Tx303 x CO159 (University of Missouri - Columbia, USA, 1998)

Population B: CML131 x CML67 (BOHN, 1998)

Population C: Ki3 x CML139 (BOHN, 1998)

Die Verhältnisse zwischen physikalischer und genetischer Distanz sind für verschiedene Chromosomenregionen angegeben und bei a, b und c für die jeweilige Kartierungspopulation A, B oder C dargestellt (da die Distanz zwischen *csu145a* und *csu93a* auf der physikalischen Karte nicht aufgelöst werden konnte, sind im entsprechenden Intervall bei Darstellung c keine Angaben möglich (k.A.)).

a
0,29 Mbp / cM
45 cM (30%)
2,66 Mbp / cM
38 cM (25%)
0,46 Mbp / cM
54 cM (36%)
4 Mbp / cM
13 cM (9%)
A
agrr118b
umc109
umc113a
bz1
umc105a
wx1
umc153
csu147
csu56d
umc95
csu61a
csu59a
csu145a
bnl5.09a
bnl14.28a
asg12
csu54b
0
15
35
39
54
63
70
72
78
86
104
104
105
119
120
121
150
114Mbp
77Mbp
7% (13 Mbp)
80% (153 Mbp)
13% (25 Mbp)
0,12
0,88
0,66
0,33
B
csu95a
umc113a
umc105a
umc153
csu147
csu59
csu93a
bnl5.09
bnl14.28
0
14
40
66
68
93
105
109
114
b
1,44 Mbp / cM
9 cM (8%)
2,35 Mbp / cM
65 cM (57%)
0,62 Mbp / cM
40 cM (35%)
C
npi253a
umc113a
csu158
umc81
umc114
csu147
csu56
umc95
csu145a
csu59
csu93a
bnl5.09
csu54b
0
13
44
53
59
62
80
92
114
126
140
145
187
c
0,27 Mbp / cM
47 cM (25%)
k.A.
26 cM (14%)
1,29 Mbp / cM
114 cM (61%)

5. Diskussion

Der Einsatz molekularer Sonden hat in der modernen Pflanzenzüchtung durch seine vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten immer mehr an Bedeutung gewonnen - angefangen bei der markergestützten Selektion bis hin zur Isolierung zusammenhängender Genomregionen bei der Klonierung von einzelnen Genen. Die molekulare Analyse und physikalische Kartierung spezifischer Genomregionen erfordern jedoch eine große Anzahl regionspezifischer Sonden. Eine wiederholte Analyse von DNA-Bibliotheken, die das gesamte Genom repräsentieren, stellt hierbei eine ineffiziente Möglichkeit zur Erhöhung der Kartierungsdichte spezifischer Genomregionen dar. Ein effizienterer Ansatz besteht in der Analyse regionspezifischer Bibliotheken (SONSTEGARD *et al.*, 1997). In der vorliegenden Arbeit wurde die Chromosomenmikrodissektion zur Erzeugung chromosomensegmentspezifischer DNA-Bibliotheken eingesetzt. Die Anzahl molekularer Marker im Bereich von QTL für Zünslerresistenz sollte damit erhöht werden. Eine Erhöhung der Markerdichte verbessert erstens die Möglichkeit zur Feinkartierung von QTL in einer Auflösung, die für eine eventuelle Klonierung notwendig ist, zweitens liefert sie informative Marker zum Einsatz in QTL-Analysen oder in der markergestützten Selektion (MATISE *et al.*, 1994). Neben der Erstellung segmentspezifischer DNA-Bibliotheken kam die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) zur physikalischen Kartierung der QTL-Region auf Maischromosom 9 zum Einsatz.

5.1. Präparation, Mikrodissektion und -amplifikation von Chromosomen

5.1.1. Chromosomenmikrodissektion

Zur Erstellung segmentspezifischer DNA-Bibliotheken ist die Identifikation des entsprechenden Bereiches im ungefärbten mikroskopischen Präparat notwendig. Je enger der zu isolierende Bereich physikalisch eingegrenzt werden kann, desto brauchbarer sind segmentspezifische Sonden aufgrund engerer Kopplung. Während in ersten Berichten zur Mikrodissektion Segmente einer Länge von 0,1 bis 0,2 Megabasen aus Polytänchromosomen von *Drosophila* isoliert wurden (SCALENGHE *et al.*, 1981), werden die kleinsten isolierbaren Segmente aus Humanchromosomenbanden auf einem DNA-Gehalt von 2 bis 4 Megabasen geschätzt

(CANNIZZARO, 1996). In zahlreichen Arbeiten fand die Mikrodissektion bei verschiedenen Pflanzenarten wie z.B. Gerste (SCHONDELMAIER *et al.*, 1993; FUKUI *et al.*, 1992), Zuckerrübe (JUNG *et al.*, 1992), Roggen (SANDERY *et al.*, 1991) und Reis (FUKUI *et al.* 1992) erfolgreich Anwendung. Jedoch wurden hierbei vorwiegend ganze Chromosomen, anstelle spezifischer Regionen oder einzelner Banden isoliert. Dies wird bei den meisten Pflanzenarten vor allem darauf zurückgeführt, daß, im Gegensatz zu Humanchromosomen, keine Bänderungstechnik verfügbar ist, die eine Identifizierung einzelner Chromosomen, oder Chromosomenbereiche möglich macht (KAO, 1996). Pflanzen mit spezifischen cytogenetischen Eigenschaften wie z.B. telotrisomische Gerstenlinien (SCHONDELMAIER *et al.*, 1993), oder monosomische Additionslinien bei Rübe (JUNG *et al.*, 1992) sind für die Chromosomenidentifikation von Vorteil.

Die Identifikation und Mikrodissektion von meiotischen Pflanzenchromosomen (Reis und Gerste: SANDERY *et al.*, 1991; Mais: STEIN *et al.*, 1998) bietet im Vergleich zu Metaphasechromosomen einen Vorteil. So sind die weniger kondensierten Pachytänchromosomen bei Mais etwa 13 mal länger als die entsprechenden mitotischen Metaphasechromosomen (FILION UND WALDEN, 1973), wodurch eine höhere Auflösung bei der Mikrodissektion erreicht werden kann. STEIN *et al.* (1998) zeigten erstmals den erfolgreichen Einsatz von Maispachytänchromosomen zur Mikrodissektion und Erstellung segmentspezifischer DNA-Bibliotheken aus der NOR von Chromosom 6. Aufgrund der morphologischen Eigenschaften (angehefteter Nukleolus in der NOR von Chromosom 6S) war eine Identifikation der betreffenden Region, sowie deren Dissektion zuverlässig und relativ einfach möglich. Um in der vorliegenden Arbeit eine Mikrodissektion aus dem Bereich des langen Arms von Chromosom 9 zu ermöglichen, waren Präparate notwendig, die in Bezug auf Identifizierbarkeit einem höheren Anspruch gerecht werden mußten. So wurde neben der SWCB und SCB resistenten Linie CML139 auch die aufgrund ihrer besonderen Eignung zur Chromosomenpräparation beschriebenen Linie KYS (gute Spreitbarkeit der Chromosomen und bekannte Verteilung heterochromatischer Bereiche; DEMPSEY, 1994) zur Präparation von Pachytänchromosomen eingesetzt. Durch kleine Modifikationen der von STEIN (1998) beschriebenen Präparationstechnik konnte bei den verwendeten Genotypen eine Spreitung der Chromosomen erzielt werden, die in den meisten Fällen eine Identifikation von Chromosom 9 ermöglichte. Jedoch lagen diese Chromosomen nicht immer so frei, daß eine Mikrodissektion ohne Gefahr einer Kontamination mit Segmenten aus anderen Chromosomenbereichen möglich gewesen wäre. Lediglich bei einem Dissektionsexperiment konnten zehn Segmente

der zentromernahen Hälfte des langen Arms von Pachytänchromosomen 9 der Linie KYS isoliert werden. Deshalb wurde - trotz der Vorteile einer Mikrodissektion von Segmenten aus Pachytänchromosomen - auch auf mitotische Metaphasechromosomen zurückgegriffen, da diese bezüglich ihrer besseren Spreitbarkeit eine höhere Ausbeute an dissektierbaren Chromosomen lieferten.

Pachytänchromosomen bieten aufgrund ihres geringeren Kondensationsgrades die Möglichkeit ihrer Identifikation nicht nur aufgrund der Länge und der Lage des Zentromers, sondern auch aufgrund sichtbarer heterochromatischer Bereiche. Diese morphologische Eigenschaft steht jedoch bei mitotischen Metaphasechromosomen nicht zur Verfügung, weshalb eine Identifikation einzelner Chromosomen erschwert wird. Um eine zuverlässige Mikrodissektion des langen Arms von Chromosom 9 zu ermöglichen, wurde auf die spezifischen cytogenetischen Eigenschaften der *B-A* Translokationslinie TB-9Lc zurückgegriffen. Aufgrund einer Translokation zwischen Chromosom 9L und dem Zentromerbereich eines B-Chromosoms konnte das hieraus resultierende telozentrische *B-9* Translokationschromosom eindeutig von den ausschließlich meta- und akrozentrischen Chromosomen des A-Genoms unterschieden werden. Da eine Identifikation der B-Zentromerregion der *B-9* Translokationschromosomen im ungefärbten mikroskopischen Präparat mit Hilfe der Phasenkontrastoptik in den meisten Fällen nicht möglich war, wurde jeweils das gesamte Chromosom dissektiert. Wegen der schwierigen Identifikation der B-Zentromerregion wurde nicht versucht, diese mit Hilfe des Lasermikrostrahls zu entfernen. In zwei Dissektionsexperimenten wurden 35, bzw. 26 *B-9* Translokationschromosomen zur Erzeugung regionspezifischer DNA-Bibliotheken isoliert.

5.1.2. Mikroamplifikation dissektierter Chromosomensegmente

Zur Amplifikation von mikrodissektierten Chromosomensegmenten stehen eine Reihe verschiedener Techniken zur Verfügung. Ansätze, bei denen die Klonierung im Mikromaßstab (nl-Volumen) durchgeführt wird, werden als Mikroklonierung bezeichnet (SCALENGHE *et al.,* 1981). Bei Mikroamplifikationsansätzen erfolgt vor einer Klonierung zunächst eine molekulare Amplifikation mittels der PCR (SAUNDERS *et al.*, 1989). Zwischen diesen beiden Ansätzen bestehen sowohl quantitative, als auch qualitative Unterschiede bezüglich der resultierenden DNA-Sonden. So ist die Ausbeute an Klonen bei einer Mikroklonierung in der Regel < 1000, wobei die durchschnittliche Insertionsgröße im Bereich von 2 bis 5 kb bei gleichzeitig geringer Redundanz liegt. Im Gegensatz hierzu liefert die PCR-vermittelte Mikroamplifikation DNA-Bibliotheken mit einem Umfang von 10^3 bis 10^7 rekombinanten

Klonen, bei einer durchschnittlichen Insertionsgrößen von 0,2 bis 0,5 kb mit teilweise hoher Redundanz. Bezüglich der Mikrodissektion unterscheiden sich die beiden Ansätze in ihrem Aufwand ebenfalls deutlich. Während zur Mikroklonierung eine hohe Anzahl dissektierter Chromosomensegmente (≥ 100) notwendig ist, reichen bei einer Mikroamplifikation zur Klonierung segmentspezifischer DNA-Bibliotheken fünf bis zehn Segmente aus (STEIN, 1998). Eine umfangreiche Diskussion beider Ansätze findet sich in den Arbeiten von SAUNDERS *et al.* (1989), GREULICH (1992) und PONELIES *et al.* (1994).

Aufgrund der Etablierung und Anwendung der Mikroamplifikation im Labor durch die Arbeiten von PONELIES *et al.* (1997), STEIN *et al.* (1998) und STEIN (1998) zur Erzeugung chromosomensegmentspezifischer DNA-Bibliotheken bei Mais, wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls dieser Ansatz gewählt. Es kam die Linker-Adapter-PCR (JOHNSON, 1990), als eine Möglichkeiten zur Mikroamplifikation der DNA dissektierten Chromatins zum Einsatz. Weitere alternative PCR-basierte Ansätze werden bei STEIN (1998) beschrieben.

STEIN *et al.* (1998) gelang erstmals die Amplifikation maisspezifischer DNA aus Maispachytänchromosomen mit der LA-PCR. Unter Anwendung dieser Technik nach Protokollen von PONELIES *et al.* (1997) und STEIN *et al.* (1998) wurde hier die DNA aus zehn dissektierten Segmenten der zentromernahen Hälfte des langen Arms von Pachytänchromosomen 9 mikroamplifiziert. Die spezifische Amplifikation von Mais-DNA konnte in einer Southern-Hybridisierung nachgewiesen werden. Eine entsprechende Negativkontrolle, die von einem Sammeltropfen ohne DNA-Fragmente ausging (Negativkontrolle I), zeigte in der Agarosegelelektrophorese ein deutliches Amplifikationsprodukt, das in seiner Größenverteilung mit den Produkten aus den dissektierten Chromosomensegmenten vergleichbar war. Eine Kontamination mit Mais-DNA konnte wegen ausbleibender Southern-Hybridisierung mit markierter genomischer Mais-DNA ausgeschlossen werden. Dieses Ergebnis stimmt mit den bei STEIN *et al.* (1998) und STEIN (1998) gemachten Beobachtungen überein. Wie eine Southern-Hybridisierung der LA-PCR-Produkte mit dem markierten Amplifikationsprodukt der Negativkontrolle I zeigte, ist die Quelle dieser DNA-Amplifikation in allen LA-PCR-Produkten vorhanden. Um aus dem Genombereich einzelne brauchbare Sonden zu generieren, ist eine möglichst quantitative Vervielfältigung und somit Klonierung des isolierten Genombereiches durch die Mikroamplifikation notwendig. Durch das Vorhandensein einer zusätzlichen DNA-Quelle in der Reaktion entsteht eine Konkurrenz zwischen der DNA dissektierter Segmente und der Fremd-DNA bei der Ligationsreaktion und nachfolgenden PCR. Hierdurch

wird die Wahrscheinlichkeit einer repräsentativen Abdeckung einer DNA-Bibliothek mit Klonen aus der gesamten dissektierten Region einerseits vermindert, andererseits die Bibliothek mit Sonden angereichert, die weder in einer Beziehung zur dissektierten Region, noch zu dem entsprechenden Organismus stehen.

Durch mehrere Southern-Hybridisierungen, bei denen die DNA-Amplifikation der Negativkontrolle I als Sonde eingesetzt wurde, konnte eindeutig eine Homologie zu bakteriellen DNA-Sequenzen nachgewiesen werden. Aufgrund der Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationen aller bei der Mikroamplifikation beteiligter Arbeitsschritte und Reaktionen ist eine Einschleusung der DNA-Kontamination von außen auszuschließen. Wahrscheinlicher ist die Annahme, daß bakterielle DNA bereits in einer der Reaktionskomponenten vorhanden war und sich durch die Vorsichtsmaßnahmen weder eliminieren, noch so weit reduzieren ließ, daß sie für die Mikroamplifikation keine Bedeutung mehr hatte. Bei der LA-PCR wird die zu amplifizierende DNA nach Restriktionsverdau mit einem spezifischen Linkeradapter ligiert, der die Primersequenz für die nachfolgende PCR trägt. Alle DNA-Sequenzen, die vor, oder zum Zeitpunkt des Restriktionsverdaus der Reaktion zugeführt wurden, können amplifiziert werden. Aufgrund dieser Überlegungen ist es wahrscheinlich, daß die Ursache für die DNA-Amplifikation in der Negativkontrolle I (Abbildung 8), vermutlich bei einer Verunreinigung der verwendeten Proteinase K-Lösung (Boehringer Mannheim) und der Restriktionsendonuklease *MboI* (Life Technologies) liegt. Diese Annahme wird durch Arbeiten von MELTZER *et al.* (1995) und ALBANI *et al.* (1993) bekräftigt, die ebenfalls von herstellerbedingten Verunreinigungen von Enzympräparationen mit Fremd-DNA sprechen.

Nachdem die Quelle der DNA-Kontamination identifiziert werden konnte, war für eine Verminderung, oder Ausschaltung der Amplifikation bakterieller DNA **i)** eine Reduzierung der Enzymkonzentration, **ii)** eine Verwendung von Enzymen anderer Hersteller, oder **iii)** die Reduzierung der Anzahl verwendeter Enzyme durch Wahl eines alternativen Mikroamplifikationsansatzes notwendig. Bereits eine Reduktion der Endkonzentration der Restriktionsendonuklease von 1 U × μl^{-1} auf 0,01 U × μl^{-1} führte in einem Testexperiment mit DNA-Lösung zu einem Ausbleiben einer DNA-Amplifikation in der Negativkontrolle ohne DNA. Hierdurch konnte die Menge an DNA-Kontamination durch *MboI* unter die Nachweisgrenze des Mikroamplifikationsansatzes von 2 bis 3 fg DNA (PONELIES *et al.*, 1997) reduziert werden. In dem Testexperiment war bei Verwendung von 1 U × μl^{-1} *MboI* das Amplifikationsprodukt sowohl bei Einsatz von 1,5 pg Mais-DNA, als auch in der entsprechenden

Negativkontrolle ohne DNA durch ein unspezifisches Bandenmuster und einer geringeren Gesamt-DNA-Konzentration auffällig. Diese Beobachtung könnte auf einen unspezifischen Abbau der DNA während der langen Inkubationszeit (16 bis 17 Stunden), in Verbindung mit einer hohen Enzymkonzentration zurückgeführt werden. Im Rahmen der Diplomarbeit von B. Weber (1998) wurden diese Beobachtungen unter vergleichbaren Reaktionsbedingungen ebenfalls gemacht.

Zur Mikroamplifikation dissektierter Chromosomensegmente ist ein Proteinase K-Verdau des Chromatins notwendig. Um eine weitere Kontaminationsquelle auszuschließen, bzw. zu minimieren, wurde auf eine Enzymlösung von einem Hersteller (Merck) zurückgegriffen, die seinen Angaben zufolge auf DNA-Kontaminationen hin getestet worden ist. Die Empfindlichkeit des hierbei angewandten Testverfahrens wird mit 1 pg DNA pro 1 mg Protein angegeben. Bei Einsatz von je 10 µg Proteinase K pro Mikroamplifikationsansatz ist eine Restmenge an Kontamination von bis zu 10 fg DNA nicht auszuschließen. Die Nachweisgrenze des zugrundeliegenden Mikroamplifikationsprotokolls wurde von PONELIES *et al.* (1997) mit 2 bis 3 fg DNA angegeben. Da in der Negativkontrolle der Mikroamplifikation dissektierter *B-9* Translokationschromosomen noch eine schwache Amplifikation nachweisbar war, ist deshalb davon auszugehen, daß durch die eingesetzte Menge an Proteinase K-Lösung eine Restmenge an DNA-Kontamination von 2 bis 10 fg DNA vorhanden war.

Durch Reduktion der Konzentration der Restriktionsendonuklease und Verwendung einer Proteinase K-Lösung eines anderen Herstellers konnte keine völlige Eliminierung, aber, im Vergleich zu den Ergebnissen aus dieser Arbeit und den Arbeiten von STEIN *et al.* (1998), eine deutliche Verminderung der DNA-Amplifikation in der Negativkontrolle I erzielt werden. Aufgrund dieser Ergebnisse erschien die Wahl eines alternativen Mikroamplifikationsansatzes (DOP-PCR) zur Reduktionen der Anzahl verwendeter Enzyme nicht mehr notwendig. Zudem hatten erste Testexperimente darauf hingedeutet, daß durch die unspezifischen Reaktionsbedingungen bei der DOP-PCR eine herstellerbedingte Verunreinigung der verwendeten *Taq*-Polymerase mit DNA ebenfalls eine Amplifikation kleinster DNA-Mengen in der Negativkontrolle zur Folge hatte.

Durch die Dissektion von 35, bzw. 26 *B-9* Translokationschromosomen in zwei getrennten Dissektionsexperimenten konnten deutlich mehr Chromosomensegmente in der Mikroamplifikation eingesetzt werden, als es STEIN (1998) zur spezifischen Amplifikation von Mais-DNA aus Pachytänchromosomen notwendig erschien. Hierdurch sollte das Verhältnis zwischen der DNA dissektierten Chromatins und der verbliebenen Restmengen an Verunreinigungen der Reaktionskomponenten mit bakterieller DNA zugunsten der Mais-DNA aus der Mikrodissektion verschoben werden. Diese große Anzahl an dissektierbaren Chromosomenregionen aus dem Bereich des langen Arms von Chromosom 9 konnte nur durch die Verwendung von mitotischen Metaphasechromosomen der Translokationslinie TB-9Lc, nicht jedoch durch Pachytänchromosomenpräparationen erzielt werden. Beide Mikroamplifikationen führten zu vergleichbaren Amplifikationsprodukten mit einer Größenverteilung von 0,2 bis 1,3 kb, deren Homologie zu Mais-DNA mittels Southern-Hybridisierung bestätigt werden konnte.

5.2. Analyse und Klonierung der Mikroamplifikationsprodukte

5.2.1. Relokalisation mittels *CISS*-Hybridisierung

Im Human- und Tierbereich wurde in zahlreichen Arbeiten komplexe Sonden aus der Chromosomenmikrodissektion mit Hilfe der FISH auf die isolierten Chromosomenregionen relokalisiert (MELTZER *et al.*, 1992, 1995; VON EGGELIN UND SPIELVOGEL, 1995; GOLDAMMER *et al.*, 1996; BARNAS *et al.*, 1995; GUAN *et al.*, 1993; ENGELEN *et al.,* 1996). Eine Anwendung dieser Technik bei Pflanzen gestaltet sich jedoch aufgrund von Unterschieden in der Organisation tierischer und pflanzlicher Genome schwierig. So führte die FISH komplexer Sonden aus der Mikrodissektion aufgrund dispers verteilter repetitiver DNA zu einem, auf nahezu allen Chromosomen verteilten Fluoreszenzsignal (PICH *et al.*, 1994; JAMILENA *et al.*, 1995; CHEN UND ARMSTRONG, 1995; FUCHS *et al.*, 1996).

In der Arbeit von PONELIES *et al.* (1997) wurde erstmals die segmentspezifische Herkunft verschiedener LA-PCR-Produkte durch die *CISS*-Hybridisierung (LICHTER *et al.*, 1988; PINKEL *et al.*, 1988) gezeigt. Durch Kompetition der markierten LA-PCR-Produkte mit unmarkierter genomischer Mais-DNA wurde die Hybridisierung regionunspezifischer repetitiver Sequenzen unterdrückt. Somit war durch den hohen Anteil regionspezifischer repetitiver Sequenzen der NOR eine Relokalisation der Mikroamplifikationsprodukte aus

diesem Bereich möglich. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war nach Kompetition aufgrund des Fehlens regionspezifischer repetitiver Sequenzen im Amplifikationsprodukt auf Chromosom 9L kein spezifisches Hybridisierungssignal auf mitotische Metaphasechromosomen des cytogenetisch normalen Genotyps KYS zu beobachten. Eine Hybridisierung der markierten Mikroamplifikationsprodukte auf Chromosomen der *B-A* Translokationslinie TB-9Lc zeigte bei entsprechender Kompetitionsstufe eine deutliche Hybridisierung in der B-Zentromerregion der *B-9* Translokationschromosomen. Eine Bestätigung, daß es sich hierbei um ein Fluoreszenzsignal aufgrund regionspezifischer repetitiver Sequenzen aus dem Zentromerbereich von B-Chromosomen handelte, lieferte die Hybridisierung der Sonden auf mitotische Metaphasechromosomen einer B-Chromosomen enthaltenden BMSC-Linie. Die Beobachtung bestätigte die Markierung der Zentromerregion der B-Chromosomen dieses Genotyps.

Da die betreffenden LA-PCR-Produkte aus einer Mikroamplifikation dissektierter *B-9* Translokationschromosomen hervorgingen, war zu erwarten, daß die Amplifikationsprodukte u.a. Sequenzen aus dem B-Chromosomenfragment enthalten. Diese Erwartung wurde durch die dargestellten *CISS*-Hybridisierungen regionspezifischer repetitiver Sequenzen aus der B-Zentromerregion bestätigt. Aufgrund dieser Ergebnisse war eine eindeutige physikalische Relokalisation der beiden Mikroamplifikationsprodukte aus *B-9* Translokationschromosomen auf die dissektierte Chromosomenregion möglich. Auch dies befindet sich in Übereinstimmung mit STEIN (1998), wonach eine Relokalisation von LA-PCR-Produkten aus Mais unter Verwendung der *CISS*-Hybridisierung nur aufgrund regionspezifischer repetitiver Sequenzen, jedoch nicht aufgrund des Anteils an Wenig-, und Einzelkopiesequenzen in der Sonde möglich ist.

5.2.2. Erzeugung und Analyse segmentspezifischer DNA-Bibliotheken

Die Klonierung und Transformation der LA-PCR-Produkte aus den Mikroamplifikationen dissektierter *B-9* Translokationschromosomen führte zu zwei, u.a. für die Genomregion von Chromosom 9L spezifischen DNA-Bibliotheken. Der Umfang dieser Bibliotheken (Anzahl rekombinanter Klone pro Gesamt-PCR Produkt) lag mit durchschnittlich 10^7 Klonen um bis zu einer Zehnerpotenz über den Ergebnissen aus Klonierungen von Mikroamplifikationsprodukten aus Humanchromosomen und Chromosomen verschiedener anderer Pflanzenspezies (2 x 10^4 JUNG *et al.*, 1992; 5 x 10^5 CHEN UND ARMSTRONG, 1995; 7 x 10^5 KAO UND YU, 1991; 1 x 10^6 KAO *et al.*, 1996 b; 4 x 10^3 bis 4 x 10^6 STEIN, 1998). Die Klonierung des

LA-PCR-Produktes aus der Mikroamplifikation dissektierter Segmente von Pachytänchromosomen (LA-PCR nach STEIN *et al.*, 1998 und PONELIES *et al.*, 1997) führte zu einer DNA-Bibliothek die in ihrem Umfang von etwa 3 x 10^5 rekombinanten Klonen pro Gesamt-PCR-Produkt vergleichbar mit den Ergebnissen anderer Arbeiten war (s. o.).

Um den Anteil repetitiver Klone einer Mikrodissektionsbibliothek zu bestimmen, wurde eine Koloniehybridisierung mit markierter genomischer Mais-DNA durchgeführt. Hierbei konnte aus einer Stichprobe von je 460 Klonen der Bibliotheken aus *B-9* Translokationschromosomen ein Anteil von 86% (TB9L-A), bzw. 85,4% (TB9L-B) Klonen identifiziert werden, die mittel- bis hochrepetitive DNA-Insertionen trugen. Im Vergleich zu den Ergebnissen von STEIN (1998), der in drei Mikrodissektionsbibliotheken aus Mais einen Anteil von 27 bis 60% repetitiver Klone aus Stichproben von 55 bis 369 analysierten rekombinanten Klonen ermittelte, zeigte sich, daß die Ergebnisse dieser Arbeit deutlich darüber liegen. Die Genome von *Triticeae*-Getreidearten, wie z.B. Weizen, Roggen und Gerste enthalten mehr als 80% repetitiver Sequenzen (FLAVELL *et al.*, 1977; BUSCH *et al.*, 1995). Für Mais wurde ein Anteil von etwa 80% an repetitiven Sequenzen ermittelt (FLAVELL *et al.*, 1974, CARELS *et al.*, 1995). Somit liegt die Größe der Fraktion repetitiver Klone in den Mikrodissektionsbibliotheken (TB9L-A und -B) in dem Bereich, der allgemein als repetitiver Sequenzenanteil bei Mais gilt.

Die Koloniehybridisierung mit einer Stichprobe von 250 Klonen aus der DNA-Bibliothek mikrodissektierter Pachytänchromosomensegmente von Chromosom 9L ergab lediglich bei 0,4% der Klone ein Hybridisierungssignal. Dieser signifikante Unterschied zu den bisher dargestellten Daten legte den Schluß nahe, daß diese Bibliothek keinen repräsentativen Anteil an Mais-DNA Sequenzen der dissektierten Chromosomenregion enthielt. Eine Analyse von 51 isolierten DNA-Insertionen aus dieser Bibliothek ergab bei etwa 12% eine Homologie zu bakteriellen DNA-Sequenzen. Dies bestätigt, daß sich die Verunreinigungen der Enzyme mit geringen Mengen bakterieller DNA negativ auf die Mikroamplifikation und Klonierung segmentspezifischer DNA-Bibliotheken auswirkte.

Wie sich in weiteren Southern-Hybridisierungen zeigte, tragen alle Klone aus der Bibliothek TB9L-A, die als potentielle Wenig-, Einzelkopieklone eingestuft worden waren, DNA-Insertionen, die homolog zu Mais sind. STEIN (1998) zeigte, daß in der DNA-Bibliothek C6.1 neben einem Anteil von 46% repetitiven Klonen 32,5% keine Homologie zu Mais-DNA

hatten. Nach den Ergebnissen dieser Arbeit ist dies vermutlich auf eine Klonierung von DNA-Verunreinigungen der Enzyme zurückzuführen.

Aufgrund der Isolierung ganzer *B-9* Translokationschromosomen zur Erstellung der segmentspezifischen Bibliotheken TB9L-A und TB9L-B, war ein gewisser Anteil B-Chromosomen spezifischer Sequenzen in den Mikroamplifikationsprodukten zu erwarten. Um zu ermitteln, wie hoch der Anteil dieser Sequenzen in den hieraus resultierenden DNA-Bibliotheken war, wurden die Stichproben von je 460 Klonen in einer differentiellen Koloniehybridisierung mit markierter genomischer DNA einer B-Chromosomen enthaltenden BMSC-Linie hybridisiert. Ein Vergleich mit den Ergebnissen aus der Koloniehybridisierung mit genomischer DNA ohne B-Chromosomen zeigte neben quantitativen Unterschieden in der Signalstärke einiger Klone auch deutliche qualitative Unterschiede. Die spezifische Hybridisierung einiger Klone der untersuchten Stichprobe mit B-Chromosomen haltiger Mais-DNA, jedoch nicht mit genomischer DNA des A-Genoms (TB9L-A: 5 Klone; TB9L-B: 1 Klon), stand in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der *CISS*-Hybridisierung. Durch Verwendung eines dieser Klone in einer FISH ließ sich das Fluoreszenzsignal in der B-Zentromerregion von *B-9* Translokationschromosomen der Linie TB-9Lc reproduzieren. Dies bestätigte nochmals, daß eine Relokalisation der LA-PCR Produkte mittels *CISS*-Hybridisierung durch regionspezifische repetitive Sequenzen der B-Zentromerregion in den Amplifikationsprodukten erfolgte.

Die durchschnittliche DNA Insertionsgröße rekombinanter Wenig-, Einzelkopieklone der Bibliothek TB9L-A und -B lag bei je 400 bp. 48,8% der durch Koloniehybridisierung vorselektierten Klone der Bibliothek TB9L-A zeigten in einer Southern-Hybridisierung einen Polymorphismus zwischen zehn getesteten Maisinzuchtlinien. Dies stellt einen signifikanten Unterschied zu den Ergebnissen von STEIN (1998) dar, der nur 15% der Wenig-, Einzelkopieklone als polymorph einstufte. Im Vergleich zu Ergebnissen aus anderen Mikrodissektionsbibliotheken von Pflanzenchromosomen liegt der Anteil polymorpher Wenig-, Einzelkopieklone dieser Arbeit ebenfalls deutlich darüber (SCHONDELMAIER *et al.*, 1993: 28% der Einzelkopieklone von Chromosom 1 H aus Gerste, Vektor-Linker-PCR; CHEN UND ARMSTRONG, 1995: 20% der Einzelkopieklone von Chromosom 21 aus Hafer; LA-PCR mit *Sau3A*). Der Anteil polymorpher Klone einer Mikrodissektionsbibliothek wird durch mehrere Faktoren beeinflußt. Diese sind u.a. die Genomorganisation des gewählten Organismus, insbesondere der dissektierten Chromosomenregion, sowie der gewählte Ansatz (Mikroklonierung, -amplifikation; verwendete Restriktionsendonuklease). Aus diesem

Grunde, aber auch aufgrund der geringen Anzahl getesteter Sonden, kann ein Vergleich des Anteils polymorpher Einzelkopieklone zu anderen Arbeiten nur bedingt erfolgen.

Nachdem die generelle Qualität der Mikroklone für eine Verwendung als RFLP-Marker zur genetischen Kartierung von STEIN (1998) bereits gezeigt worden war, konnte auch in dieser Arbeit ein polymorpher Einzelkopieklon der Bibliothek TB9L-A in der Population Ac7729 × CML247 kartiert werden. Die Kartenpositionen liegen auf den Chromosomen 3 und 8 und stimmen somit nicht mit der isolierten Region überein. Aus Mikrodissektionsbibliotheken anderer Arbeiten kartierten ebenfalls Klone nicht in der dissektierten Chromosomenregion (DAVIS *et al.*, 1990; KAO UND YU, 1991; JUNG *et al.* 1992; BARDENHEUER *et al.,* 1994; STEIN, 1998). Wie in diesem Zusammenhang festgestellt wurde (STEIN, 1998), ist auch in der vorliegenden Arbeit nicht auszuschließen, daß bei der Mikrodissektion eine Kontamination mit Chromosomensegmenten aus anderen Genomregionen erfolgte. Weiterhin wäre denkbar, daß die Ursache in der Evolution des Maisgenoms begründet liegt. So fanden mehrere Umorganisationen statt (HELENTJARIS *et al.*, 1988; HELENTJARIS, 1995) die chromosomenübergreifende zusammenhängende homoeologe Bereiche entstehen ließen. Bei weiteren genetischen Kartierungen polymorpher Wenigkopieklone der Bibliothek TB9L-A ist eine genetische Relokalisation der dissektierten Region nicht auszuschließen. Die Suche nach alternativen Restriktionsendonukleasen zur Verwendung in der LA-PCR läßt auf eine Selektion kodierender Wenig-, Einzelkopieklone hoffen. Ob dadurch der Anteile repetitiver Klone zugunsten polymorpher Einzelkopieklone verschoben werden kann, müssen aber weitergehende Analysen zeigen. Erste Arbeiten wurden in diesem Zusammenhang im Rahmen der Diplomarbeit von WEBER (1998) durchgeführt. Ansätze, die nichtpolymorphe Mikroklone für genetische Kartierungen einsetzen können, wäre eine Verwendung nullisomer Linien oder monosomer Additionslinien (JUNG *et al.*, 1992; SCHONDELMAIER *et al.*, 1993; CHEN UND ARMSTRONG, 1995), oder dem Einsatz der Klone als Vorstufe von SSR- (*´simple sequence repeat´* WEBER UND MAY, 1989), bzw. STR-Markern (*´short tandem repeat´* EDWARDS *et al.*, 1991).

5.3. Physikalische Kartierung molekularer Marker

Neben der Mikrodissektion von Chromosomenregionen zur Entwicklung neuer molekularer Marker im Bereich der Zünslerresistenz bei Mais war ein weiteres Ziel dieser Arbeit die physikalische Kartierung der auf Chromosom 9 genetisch kartierten QTL-Region. Des weiteren sollte versucht werden, Wenig- und Einzelkopieklone aus der Mikrodissektionsbibliothek TB9L-A physikalisch zu den QTL-flankierenden RFLP-Sonden in Beziehung zu setzen. Die physikalische Karte der Chromosom 9 Region sollte mit der genetischen verglichen werden. Die physikalische Kartierung von Referenzpunkten kann bei einer zukünftigen Klonierung von Genen hilfreich sein.

Die Abschätzung physikalischer Distanzen zwischen eng gekoppelten DNA-Markern ist vorwiegend von der Verfügbarkeit langer, zusammenhängender DNA-Fragmente (*´contigs´*), oder einer Anwendung der Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) (SCHWARTZ UND CANTOR, 1984) abhängig. Die PFGE ermöglicht die Auftrennung großer DNA-Moleküle bis zu einer Länge von zehn Megabasen (VANDAELEN UND ZABEL, 1992). Während diese Techniken erfolgreich bei Pflanzen mit kleinen Genomen, wie beispielsweise *Arabidopsis thaliana* L. und Reis Anwendung finden, ist diese bei Organismen mit großen Genomen, wie z.B. Mais und Weizen aufgrund der Ploidiestufe oder der Duplizierung eines Großteils des Genomes eher schwierig (JIANG *et al.*, 1996). Die PFGE fand u.a. auch deshalb keine Anwendung, weil die flankierenden genetischen Marker zu weit auseinander lagen.

Die FISH entwickelte sich in den letzten Jahren zu einem wichtigen Ansatz zur physikalischen Anordnung von DNA Sequenzen entlang eines Chromosoms. Die Auflösung einer visuellen Kartierung reicht von einigen Megabasen bis hin zu einigen wenigen Kilobasen (HEISKANEN *et al.*, 1996). Vornehmlich im Humanbereich bietet die FISH-Technik die Möglichkeit zur physikalischen Kartierung von Genen, Markern, sowie Wenig-, Einzelkopiesequenzen und ist damit ein wichtiger Bestandteil zahlreicher Genomkartierungsprojekte (BRAY-WARD *et al.*, 1996; FERGUSON *et al.*, 1996).

Bei Pflanzen wurde die FISH bisher vorwiegend zur Kartierung repetitiver DNA-Sequenzen eingesetzt (JIANG UND GILL, 1994). In zahlreichen Arbeitsgruppen wurde bisher intensiv an der Erhöhung der Empfindlichkeit der FISH zur Kartierung von Wenig-, Einzelkopiesequenzen auf Pflanzenchromosomen gearbeitet. So wurden Wenig- und Einzelkopiesequenzen

detektiert, die eine 17-kb T-DNA in *Crepis capillaris* L. (AMBROS *et al.*, 1986), das β-Tubulin Gen in Luzerne (SCHAFF *et al.*, 1990) die B-Hordein Gengruppe mit mehr als zehn Kopien in Gerste (LEHFER *et al.*, 1993) und das α-Amylase-2 Gen in Weizen (LEITCH UND HESLOP-HARRISON, 1993) enthalten. Die Nachweisgrenze detektierbarer Ziel-DNA Sequenzen auf Pflanzenchromosomen liegt über 10 kb (JIANG UND GILL, 1994; LAPITAN *et al.*, 1997). Da RFLP-Sonden eine durchschnittliche Fragmentlänge von 500 bis 700 bp, die Sonden aus den Mikrodissektionsbibliotheken von 400 bp aufweisen, ist deren direkter Nachweis auf Chromosomen nicht möglich. Die Verfügbarkeit von Klonen, die große genomische DNA-Insertionen tragen, ermöglicht eine Detektion kleiner Sonden bei der physikalischen Kartierung durch Verwendung spezifischer großer Klone. So gibt es u.a. *´yeast artificial chromosome´* (YAC) Bibliotheken für verschiedene Pflanzenarten, wie *Arabidopsis* (GILL UND SOMERVILLE, 1991), Tomate (MARTIN *et al.*, 1992), Mais (EDWARDS *et al.*, 1992) und Gerste (KLEINE *et al.*, 1993), sowie *´bacterial artificial chromosome´* (BAC) Bibliotheken für Sorghum (WOO *et al.*, 1994), Reis (WANG *et al.*, 1995), *Arabidopsis* (CHOI *et al.*, 1995) und Gerste (LAPITAN *et al.*, 1997). Verschiedene Arbeiten zeigten den erfolgreichen Einsatz großer genomischer YAC- und BAC-Klone in der FISH bei Pflanzen (HANSON *et al.*, 1995; JIANG *et al.*, 1995; ZHU *et al.*, 1996; LAPITAN *et al.*, 1997).

5.3.1. *CISS*-Hybridisierung von Cosmidklonen zur physikalischen Kartierung

Es konnte erstmals der erfolgreiche Einsatz von Cosmidklonen zur physikalischen Kartierung von RFLP-Sonden mittels *CISS*-Hybridisierung bei Mais demonstriert werden. Hierzu stand ein Teil einer von Llaca und Messing (Rutgers University, NY, USA) erstellten Cosmidbibliothek zur Verfügung. Es war möglich, für die QTL-flankierenden RFLP-Marker *csu93a*, *csu145a*, *csu56* und *umc105a*, sowie für die Klone #5, #34 und #45 aus der Mikrodissektionsbibliothek TB9L-A, homologe Cosmidklone zu isolieren. Mit den RFLP-Sonde *p-csu147* und der Einzelkopieklonklon #14 wurden keine homologen Cosmide isoliert. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, daß die Fraktion der Cosmidbibliothek bereits einmal amplifiziert worden war und somit keine vollständige Abdeckung des Maisgenoms mehr gewährleistet war (LLACA, pers. Mitteilung).

Bei Hybridisierung mit dem *p-umc105* spezifischen Cosmid *umc105-cos* war ein deutliches Fluoreszenzsignal am telomeren Ende des kurzen Arms von Chromosom 9 in bis zu 80% der untersuchten Metaphasen sichtbar. Die im Vergleich dazu eher schwachen Hybridisierungssignale der Sonden *csu145-cos* und *csu93-cos* am telomeren Ende von Chromosom 9L waren

vermutlich durch einen geringeren Anteil detektierbarer spezifischer Wenig-, Einzelkopiesequenzen innerhalb der DNA-Insertionen bedingt.

Aufgrund des Anteils von 80% repetitiver Sequenzen innerhalb des Maisgenoms ist bei einer DNA-Insertion von 35-38 kb durchschnittlich mit 7 bis 8 kb Wenig- und Einzelkopiesequenzen innerhalb der Cosmidklone zu rechnen. JIANG UND GILL (1994) untersuchten die Sensitivität der FISH bei Mais, indem sie den 3,5 kb umfassenden genomischen Klon *KSU3* als Sonde einsetzten. Dieser Klon kartiert genetisch auf Chromosom 10S und kommt in verschiedenen Maislinien als *´tandem repeat´* in unterschiedlicher Wiederholungszahl vor (HONG *et al.*, 1993). Eine Hybridisierung mit einer Linie, die zehn Kopien dieses Proteinkinasegens enthält, führte in über 90% der Zellen zu einem deutlichen Fluoreszenzsignal auf den Chromatiden beider homologer Chromosomregionen 10S. Hingegen war bei Hybridisierungen mit anderen Maislinien, die eine, oder wenige Kopien des Gens enthielten, nur schwächere Signale in wesentlich geringerer Frequenz detektierbar.

Die Hybridisierungen der drei Cosmidklone, die homolog zu Klonen aus der Mikrodissektionsbibliothek TB9L-A waren, sowie des Klons *csu56-cos* zeigten keine detektierbaren, spezifischen Fluoreszenzsignale auf mitotische Metaphasechromosomen. Die Ergebnisse der *CISS*-Hybridisierungen deuteten darauf hin, daß diese Cosmidklone einen höheren Anteil repetitiver Sequenzen gegenüber den Klonen enthielten, die homolog zu genetisch kartierten RFLP-Markern waren. So führte eine entsprechende Menge an Kompetitor-DNA bei den Sonden *umc105-cos*, *csu145-cos* und *csu93-cos* bereits zu einer nahezu vollständigen Unterdrückung von Hybridisierungssignalen aufgrund unspezifischer repetitiver DNA-Sequenzen. Die zu den Mikrodissektionsklonen homologen Cosmidklone benötigten hierzu die drei- bis vierfache Menge an Kompetitor-DNA.

Eine Erklärung für den sehr unterschiedlichen Anteil repetitiver DNA-Sequenzen innerhalb der Cosmidklone liegt vermutlich in der Verteilung repetitiver Sequenzen im Maisgenom. So sind Einzelkopiesequenzen in regelmäßigen Abständen von repetitiven Insertionen unterbrochen (HAKE UND WALBOT, 1980). Dies könnte zur Folge haben, daß die Summe der Einzelkopiesequenzen innerhalb eines Cosmidklons für eine Detektion mit Hilfe der FISH nicht ausreichend ist, während diese bei einem anderen Klon aus einem anderen Genombereich für einen Nachweis ausreicht. Einen Hinweis darauf könnte die Eigenschaft der Sonden, zu denen die Klone homolog sind, geben. Alle erfolgreich hybridisierten Cosmidklone sind auf

bereits genetisch kartierte RFLP-Sonden zurückzuführen, wohingegen die Cosmidklone, homolog zu Klonen der Bibliothek TB9L-A, in der *CISS*-Hybridisierung nicht lokalisierbar waren. Während einer RFLP-Kartierung erfolgt eine Selektion auf Klone, die in der Lage sind, einen Polymorphismus aufzuzeigen. Gleichzeitig sollen diese Sonden nur in einer oder wenigen Kopien im Genom vorkommen, so daß eine eindeutige Zuordnung zu einem Genombereich möglich wird. Durch die Verwendung genetisch bereits kartierter molekularer Sonden konnten deshalb Cosmidklone aus einem Genombereich isoliert werden, der mit Wenig- und Einzelkopiesequenzen angereichert zu sein scheint. Diese Ergebnisse legen den Schluß nahe, daß Cosmidklone zwar für einen Einsatz in der FISH bei Mais grundsätzlich geeignet sind, daß jedoch nicht jeder zur Hybridisierung verwendete Klon eine hierfür ausreichende Länge an Wenig- und Einzelkopiesequenzen enthält. Um dennoch eine physikalische Kartierung der Mikrodissektionsklone zu erreichen, wäre über die Verwendung genomischer Klone mit größeren DNA-Insertionen, oder Maßnahmen für eine geeignete Signalverstärkung nachzudenken.

5.3.2. Vergleich zwischen genetischer und physikalischer Distanz molekularer Marker

Durch genetische Abstände werden die Rekombinationswahrscheinlichkeiten zweier Kartierungspunkte, gemessen in centi-Morgan [cM], ausgedrückt, während physikalische Distanzen deren Abstand in Basenpaaren auf dem Chromosom beschreiben. Bei Genomkartierungen wurde häufig eine Diskrepanz zwischen relativer physikalischer und genetischer Distanz gefunden. So wurden bei *Triticum turgidum* L. und *T. aestivum* L. einige Gene, die genetisch sehr eng mit dem Zentromer gekoppelt sind, physikalisch in der distalen Hälfte der entsprechenden Chromosomenarme lokalisiert. Auch wurde die genetische Distanz zwischen molekularen Markern der distalen Chromosomenregion auf der genetischen Karte oftmals größer angegeben, als die entsprechende physikalische Distanz nahelegte (DVORAK *et al.*, 1984; SEARS, 1984; SNAPE *et al.*, 1985; DVORAK UND APPELS, 1986; CURTIS UND LUKASZEWSKI, 1991; HOHMANN *et al.*, 1994). Die Rekombinationswahrscheinlichkeiten entlang eines Chromosomenarms sind also nicht gleichmäßig verteilt - vielmehr findet in der jeweils distalen Chromosomenregion häufiger ein Austausch statt, als in der proximalen Region. Somit sind auf der genetischen Karte distale Regionen überproportional gestreckt, während proximale Regionen komprimiert sind (JAMPATES UND DVORAK, 1986; CURTIS UND LUKASZEWSKI, 1991).

Es konnten drei genetisch kartierte RFLP-Sonden aus der QTL-Region für Resistenz gegen SWCB und SCB auf Maischromosom 9 mit Hilfe der *CISS*-Hybridisierung entsprechender Cosmidklone physikalisch lokalisiert werden. Hierdurch wurde ein Vergleich zwischen der genetischen und physikalischen Ausdehnung der betreffenden Region entlang des Chromosoms möglich. Während das Intervall zwischen den flankierenden Markern *umc105a* und *csu93a* etwa 80% der physikalischen Länge von Chromosom 9 umfaßt, ist die Größe des genetischen Intervalls von der jeweiligen genetischen Karte abhängig. Neben den Kopplungskarten der Populationen CML131 × CML67, sowie Ki3 × CML139, die zur Kartierung der QTL für Zünslerresistenz herangezogen wurden (BOHN, 1998), fand ein Vergleich mit der genetischen Karte der *University of Missouri* (UMC 1998 RFLP-Karte von *Zea mays* L.) statt, die aus der Kartierungspopulation Tx303 × CO159 hervorging. Aufgrund einer geschätzten Länge von 191 Mbp für Chromosom 9 (BENNETT UND LAURIE, 1995) ließ sich das Verhältnis zwischen genetischer und physikalischer Distanz, in Abhängigkeit der jeweiligen Chromosomenregion, darstellen. Es konnte bestätigt werden, daß die Rekombinationsfrequenzen distaler Chromosomenregionen höher sind, als die proximaler Bereichen nahe des Zentromers. Das Verhältnis zwischen physikalischer Distanz und Rekombinationsfrequenz variierte bei der UMC-Karte von 0,29 Mbp × cM^{-1} im distalen Bereich des langen, bzw. 0,46 Mbp × cM^{-1} des kurzen Chromosomenarms, bis zu 4 Mbp × cM^{-1} im proximalen Bereich von 9S. Ähnliche Verhältnisse ergaben sich auch für die Kartierungspopulationen CML131 × CML67 und Ki3 × CML139.

Eine physikalische Auflösung der beiden Marker *csu145a* und *csu93a* war anhand der *CISS*-Hybridisierungen, aufgrund des hohen Kondensationsgrades der verwendeten mitotischen Metaphasechromosomen, nicht zuverlässig möglich. Für eine feinere Auflösung von molekularen Sonden, v.a. im distalen Bereich, erscheint eine Verwendung von weniger kondensierten Chromosomen, wie z.B. Pachytänchromosomen, notwendig.

Die QTL-Region, die einen verhältnismäßig großen Beitrag zur Resistenz gegen *Diatraea spp.* leistet (BOHN, 1998), umfaßt nahezu das gesamte Chromosom 9. Da diese Region, je nach betrachteter Kartierungspopulation und Schadinsekt, ein oder zwei QTL trägt, wäre eine weitergehende physikalische Kartierung anzustreben. Hierdurch könnte geklärt werden, ob der auf Chromosom 9S von *umc105a* flankierte QTL nur auf den kurzen Arm begrenzt ist, oder über das Zentromer hinaus in den langen Arm reicht. Da für die molekularen Marker in der vorliegenden Cosmidbibliothek keine homologen Klone gefunden werden konnten, bzw.

der *csu56* spezifische Klon nicht lokalisierbar war, ist für eine weitergehende physikalische Kartierung eine Verwendung von Klonen mit größeren DNA-Insertionen (YAC oder BAC-Klone), oder eine geeignete Signalverstärkung unter Einsatz eines anderen Hybridisierungsprotokolls anzustreben.

5.4. Erstellung segmentspezifischer molekularer Marker mittels Mikrodissektion und physikalische Kartierung durch *CISS*-Hybridisierung?

Unter Betrachtung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erscheint gegenwärtig die Mikroamplifikation bei Mais für eine Anreicherung einer spezifischen Chromosomenregion mit molekularen Markern nicht geeignet. Es konnte gegenüber STEIN (1998) eine Verbesserung des Protokolls in Bezug auf eine Amplifikation bakterieller DNA aufgrund von Verunreinigungen in Enzymlösungen erzielt werden. Für einen effizienten Einsatz dieser Technik, sollte das Mikroamplifikationsprotokoll dahingehend modifiziert werden, daß eine bevorzugte Amplifikation von Wenig-, Einzelkopiesequenzen erreicht werden kann, bzw. repetitive Sequenzen vor einer Klonierung ausselektiert werden können. Eine Analyse alternativer Enzym/Adapterkombinationen zur Amplifikation kodierender DNA-Sequenzen findet sich in der Arbeit von WEBER (1998). Neben dieser Form der biochemischen Selektion wäre auch über eine mechanische Selektion aufgrund der Reassoziationseigenschaften repetitiver DNA nachzudenken.

Es konnte die physikalische Lokalisation von molekularen Markern durch *CISS*-Hybridisierung mit Hilfe von Cosmidklonen erstmals erfolgreich dargestellt werden. Hierdurch war es möglich, eine physikalische Karte der QTL-flankierenden Marker für Zünslerresistenz auf Chromosom 9 zu erstellen. Um diese Karte mit weiteren Markerpositionen anreichern zu können, wird eine Verwendung von Klonen mit größeren DNA-Insertionen empfohlen.

6. Zusammenfassung

Die Lepidoptera *Diatraea grandiosella*, Dyar, und *Diatraea saccharalis*, Fabricius (Lepidoptera, Pyralidae), zählen zu den bedeutendsten Schadfaktoren des Maises in Mittel- und Lateinamerika. Neben dem ökologisch und ökonomisch bedenklichen Einsatz von Insektiziden bietet der Anbau insektenresistenter Maissorten eine wirksame Bekämpfungsmöglichkeit im Rahmen eines integrierten Pflanzenschutzes. In vorausgegangenen Studien war die Vererbung der Resistenz in Mais gegen *Diatraea spp.* zur Entwicklung von markergestützten Selektionsprogrammen untersucht worden. Zahlreiche quantitative Merkmalsloci (QTL) konnten hierbei kartiert werden. Hierbei zeigte sich, daß auf Chromosom 9 QTL lokalisiert sind, die sowohl phänotypisch, als auch genotypisch einen großen Effekt auf das Ausmaß der Resistenz haben. Eine Erhöhung der Markerdichte durch Hinzufügung zusätzlicher polymorpher Marker im Bereich kartierter QTL für Zünslerresistenz kann zu einer Verminderung des teilweise noch großen Abstandes flankierender molekularer Marker beitragen. Dies wäre sowohl für eine effizientere markergestützte Selektion, als auch für eine mögliche Isolierung von Resistenzgenen zur Übertragung in anfälliges Zuchtmaterial mit biotechnologischen Ansätzen, sinnvoll.

Ziel dieser Arbeit war, mit Hilfe der Chromosomenmikrodissektion und der Entwicklung segmentspezifischer DNA-Bibliotheken neue - aus dem Bereich kartierter QTL auf Chromosom 9 stammende - molekulare Marker zu erzeugen. Weiterhin sollte unter Anwendung der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung eine physikalische Kartierung der QTL-Region auf diesem Chromosom erfolgen. Im einzelnen wurden folgende Arbeiten durchgeführt: (1) Herstellung mikroskopischer Chromosomenpräparate die eine Identifikation der zu dissektierenden Zielregion ermöglichen; (2) Mikrodissektion und -amplifikation regionspezifischer DNA aus dem Bereich des langen Arms von Chromosom 9; (3) Optimierung der Mikroamplifikation hinsichtlich einer herstellerbedingten DNA-Verunreinigung in verwendeten Enzymlösungen; (4) Herstellung segmentspezifischer DNA-Bibliotheken durch Klonierung regionspezifischer Mikroamplifikationsprodukte; (5) Charakterisierung rekombinanter Klone aus DNA-Bibliotheken der Mikroamplifikation; (6) Physikalische Kartierung der QTL-Region auf Chromosom 9 mit Hilfe der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung. Folgende Ergebnisse wurden erzielt: Die Techniken zur Präparation von ungefärbten Pachytänchromosomen wurden weiterentwickelt, so daß eine Identifikation von Chromosom 9 möglich war. Eine *B-A* Trans-

lokationslinie wurde erfolgreich zur Präparation und Identifikation mitotischer Metaphasechromosomen 9 eingesetzt. Mit Hilfe von Glasnadeln und der Lasermikrodissektion wurden Chromosom 9L regionspezifische Segmente aus Pachytän- und mitotischen Metaphasepräparationen isoliert. Die Mikroamplifikation isolierter DNA erfolgte mittels Linkeradapter-PCR (LA-PCR) in Standardreaktionsgefäßen. Eine nicht maisspezifische DNA-Amplifikation bei der LA-PCR konnte als herstellerbedingte Verunreinigung von verwendeten Enzymlösungen mit bakterieller DNA erkannt werden. Die Mikroamplifikation wurde daraufhin erfolgreich modifiziert, so daß diese Kontaminationen keinen nachweisbaren negativen Einfluß mehr hatten. Die durchschnittliche Größenverteilung der LA-PCR-Produkte lag zwischen 200 und 800 bp. Die Maisspezifität konnte durch Southern-Hybridisierung, die Segmentspezifität der Produkte aus den *B-9* Translokationschromosomen mittels *CISS*-Hybridisierung eindeutig bestätigt werden. Die LA-PCR-Produkte wurden zu drei spezifischen DNA-Bibliotheken kloniert. Der Umfang dieser Bibliotheken reichte von $2{,}8 \times 10^5$ bis zu $2{,}1 \times 10^7$ rekombinanten Klonen pro 100 µl PCR-Produkt. Die Größe der DNA-Insertionen lag zwischen 200 und 1000 bp. Der ermittele Anteil repetitiver Klone aus der Mikroamplifikation mit optimiertem LA-PCR-Protokoll lag mit 86% im Bereich des Anteils repetitiver Sequenzen im Maisgenom (80%). Eine Analyse von Einzel- und Wenigkopieklonen aus der ersten segmentspezifischen DNA-Bibliothek aus *B-9* Translokationschromosomen ergab einen Anteil von 48,8% (20/41) polymorphen Klonen. Ein Einzelkopieklon konnte genetisch kartiert werden.

Zur physikalischen Kartierung molekularer Marker wurden aus einer Mais-Cosmidbibliothek spezifische Cosmidklone mit Sequenzhomologien zu QTL-flankierenden RFLP-Sonden, sowie zu Wenigkopieklonen aus einer hier hergestellten segmentspezifischen DNA-Bibliothek isoliert. Die physikalische Lokalisation von molekularen Markern durch *CISS*-Hybridisierung mit Hilfe von Cosmidklonen gelang erstmals bei Mais. Eine physikalische Karte der QTL-flankierenden Marker für Zünslerresistenz auf Chromosom 9 wurde erstellt. Diese zeigte, daß die bisher genetisch kartierten QTL auf Chromosom 9 80% der physikalischen Chromosomenlänge umfassen. Aus dem Vergleich der physikalischen Markerpositionen mit denen auf der genetischen Karte ließen sich die Rekombinationsfrequenzen in verschiedenen Regionen von Chromosom 9 darstellen. Aufgrund des hohen Anteils repetitiver Sequenzen im Maisgenom ließen sich nicht alle isolierten Cosmidklone erfolgreich durch *CISS*-Hybridisierung darstellen. Um die physikalische Karte mit weiteren Markern anreichern zu können, scheint eine teilweise Verwendung von Klonen mit größeren DNA-Insertionen notwendig.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte die Technik der Mikroamplifikation zur Erstellung regionspezifischer DNA-Bibliotheken bei Mais verbessert werden. Aufgrund des hohen Anteils repetitiver Sequenzen im Maisgenom war aber die Ausbeute an polymorphen Wenig- und Einzelkopieklonen gering, so daß eine weitere Optimierung der Mikroamplifikation hinsichtlich einer Reduzierung repetitiver Sequenzen notwendig erscheint. Die physikalische Kartierung der QTL-Region für Resistenz gegen *Diatraea spp.* auf Chromosom 9 kann als Ausgangspunkt für eine Isolierung entsprechender Resistenzgene dienen.

7. Literatur

Albani, D., Cote, M. J., Armstrong, K. C., Chen, Q., Segal, A., and Robert, L. S. (1993). PCR amplification of microdissected wheat chromosome arms in a simple 'single tube' reaction. Plant Journal 4:899-903.

Alpert, K. B. and Tanksley, S. D. (1996). High-resolution mapping and isolation of a yeast artificial chromosome contig containing *fw*2.2: A major fruit weight quantitative trait locus in tomato. Proc. Natl. Acad. Sci., USA 93:15503-15507.

Ambros, P. F., Matzke, M. A., and Matzke, A. J. M. (1986). Detection of a 17kb unique sequence (T-DNA) in plant chromosomes by in situ hybridization. Chromosoma 94:11-18.

Ananiev, E. V., Phillips, R. L., and Rines, H. W. (1998). Chromosome-specific molecular organization of maize (*Zea mays* L.) centromeric regions. Proc. Natl. Acad. Sci., USA 95:13073-13078.

Ananiev, E. V., Riera-Lizarazu, O., Rines, H. W., and Phillips, R. L. (1997). Oat-maize chromosome addition lines: a new system for mapping the maize genome. Proc. Natl. Acad. Sci., USA 94:3524-3529.

Bardenheuer, W., Szymanski, S., Lux, A., Lüdecke, H. J., Horsthemke, B., Claussen, U., Senger, G., Smith, D. I., Wang, N. D., LePaslier, D., Cohen, D., Heppell-Parton, A., Rabbitts, P., Schütte, J., and Opalka, B. (1994). Characterization of a microdissection library from human chromosome region 3p14. Genomics 19:291-297.

Barnas, C. M., Onyango, P., Ellmeier, W., Lengauer, W., Kleiner, E., Henn, T., Brunner, C., Stapleton, P., and Weith, A. (1995). Determination and regional assignment of grouped sets of microclones in chromosome 1pter-p35. Genomics 29:607-615.

Beckett, J. D. (1978). B-A translocations in maize, I. Use in locating genes by chromosome arms. Journal of Heredity 69:27-36.

Bennett, M. D. and Laurie, D. A. (1995). Chromosome size in maize and sorghum using EM serial section reconstructed nuclei. Maydica 40:199-204.

Boehringer Mannheim (1996). Nonradioactive *in situ* Hybridization, application manual, 2nd edn. Boehringer Mannheim, GmbH, Biochemica.

Bohn, M. (1998). QTL mapping of insect resistance against *Diatraea spp.* in two populations of F_3 lines in tropical maize (*Zea mays* L.). Shaker Verlag, Aachen: Dissertation Universität Hohenheim.

Bohn, M., Khairallah, M. M., Jiang, C., Gonzáles-de-León, D., Hoisington, D. A., Utz, H. F., Deutsch, J. A., Jewell, D. C., Mihm, J. A., and Melchinger, A. E. (1997a). QTL mapping in tropical maize: II. Comparison of genomic regions for resistance to *Diatraea spp.* Crop Science 37:1892-1902.

Bohn, M., Groh, S., Khairallah, M. M., Willcox, M., Jiang, C., Gonzáles-de-Léon, D., Hoisington, D. A., and Melchinger, A. E. (1997b). Genetische Analyse von Resistenzen gegen Schadinsekten (*Diatraea spp.*) des Maises (*Zea mays* L.) mittels molekularer Marker. Vortr. Pflanzenzüchtung 38:147-168.

Bohn, M., Khariallah, M. M., González-de-León, D., Hoisington, D. A., Utz, H. F., Deutsch, J. A., Jewell, D. C., Mihm, J. A., and Melchinger, A. E. (1996). QTL mapping in tropical maize: I. Genomic regions affecting leaf feeding resistance to sugarcane borer and other traits. Crop Sci. 36:1352-1361.

Bray-Ward, P., Menninger, J., Lieman, J., Mokady, N., Banks, A., and Ward, D. C. (1996). Integration of the cytogenetic, genetic, and physical maps of the human genome by FISH mapping of CEPH YAC clones. Genomics 32:1-14.

Brown, J. and Sundaresan, V. (1991). A recombination hot spot in the maize *A1* intragenic region. Theor. Appl. Genet. 81:185-188.

Busch, W., Martin, R., Herrmann, R. G., and Hohmann, U. (1995). Repeated DNA sequences isolated by microdissection. I. Karyotyping of barley (*Hordeum vulgare* L.). Genome 38:1082-1090.

Cannizzaro, L. A. (1996). Chromosome microdissection - a brief overview. Cytogenetics and Cell Genetics 74:157-160.

Carels, N., Barakat, A., and Bernardi, G. (1995). The gene distribution of the maize genome. Proc. Natl. Acad. Sci., USA 92:11057-11060.

Chen, Q. and Armstrong, K. (1995). Characterization of a library from a single microdissected oat (*Avena sativa* L.) chromosome. Genome 38:706-714.

Choi, S., Creelman, R. A., Mullet, J. E., and Wing, R. A. (1995). Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library of *Arabidopis thaliana*. Plant Mol. Biol. 13:124-128.

Church, G. M. and Gilbert, W. (1984). Genomic sequencing. Proc. Natl. Acad. Sci., USA 81:1991-1995.

CIMMYT (1991). CIMMYT Maize Program. Announcement of CIMMYT inbred lines CML1 to CML139. ed. CIMMYT, Mexico City.

--- (1988). Maize production regions in developing countries. Maize program Internal Document. ed. CIMMYT, Mexico City.

Civardi, L., Xia, Y., Edwards, K. J., Schnable, P. S., and Nikolau, B. J. (1994). The relationship between genetic and physical distances in the cloned *al-sh2* interval of the *Zea mays* L. genome. Proc. Natl. Acad. Sci., USA 91:8268-8272.

Curtis, C. A. and Lukaszewski, A. J. (1991). Genetic linkage between C-bands and storage protein genes in chromosome 1B of tetraploid wheat. Theor. Appl. Genet. 81:245-252.

Davies, K. E., Young, B. D., Elles, R. G., Hill, M. E., and Williamson, R. (1981). Cloning of a representative genomic library of the human X chromosome after sorting by flow cytometry. Nature 293:374-376.

Davies, L. M., Senger, G., Lüdecke, H. J., Claussen, U., Horsthemke, B., Zhang, S. S., Metzroth, B., Hohenfellner, K., Zabel, B., and Shows, T. B. (1990). Somatic cell hybrid and long-range physical mapping of 11p13 microdissected genomic clones. Proc. Natl. Acad. Sci., USA 87:7005-7009.

Dempsey, E. (1994) Traditional analysis of maize pachytene chromosomes. S. 432-441. *In* Freeling, M. and Walbot, V. (ed.) The Maize Handbook. Springer-Verlag, New York, USA.

Dvorak, J. and Appels, R. (1986). Investigation of homologous crossing-over and sister chromatid exchange in the wheat *NorB2* locus coding for rRNA and the *GliB2* locus coding for gliadins. Genetics 113:1037-1056.

Dvorak, J., Chen, K. C., and Giogi, B. (1984). The C-band pattern of a Ph^- mutant of durum wheat. Can. J. Gen. Cytol. 26:360-363.

Edwards, A., Civitello, A., Hammond, H. A., and Caskey, C. T. (1991). DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. Am. J. Hum. Genet. 49:746-756.

Edwards, K. J., Thompson, H., Edwards, D., de Saizieu, A., Sparks, C., Thompson, J. A., Greenland, A. J., Eyers, M., and Schuch, W. (1992). Construction and characterization of a yeast artificial chromosome library containing three haploid genome maize genome equivalents. Plant Mol Biol 19:299-308.

Engelen, J. J. M., Loots, W. J. G., Motoh, P. C. C., Moog, U., Hamers, G. J. H., and Geraedts, J. P. M. (1996). Marker chromosome identification by micro-FISH. Clin.

Genet. 49:242-248.

Ferguson, M., Brown, S., and Knudson, D. (1996). FISH digital imaging microscopy in mosquito genomics. Parasitol. Today 12:91-96.

Filion, W. G. and Walden, D. B. (1973). Karyotype analysis: the detection of chromosomal alterations in the somatic karyotype of *Zea mays* L. Chromosoma 41:183-194.

Flavell, R. B., Bennet, M. D., Smith, J. B., and Smith, D. B. (1974). Genome size and the proportion of repeated sequence DNA in plants. Biochem. Genet. 12:257-269.

Flavell, R. B., Rimpau, J., and Smith, D. B. (1977). Repeated sequence DNA relationships in four cereal genomes. Chromosoma 63:205-222.

Fuchs, J., Houben, A., Brandes, A., and Schubert, I. (1996). Chromosome ´painting´in plants - a feasible technique? Chromosoma 104:315-320.

Fukui, K., Minezawa, M., Kamisugi, Y., Ishikawa, M., Ohmido, N., Yanagisawa, T., Fujishita, M., and Sakai, F. (1992). Microdissection of plant chromosomes by argon-ion laser beam. Theor. Appl. Genet. 84:787-791.

Gill, E. and Somerville, C. (1991). Construction and characterization of a yeast artificial chromosome library of *Arabidopsis* which is suitable for chromosome walking. Theor. Appl. Genet. 226:484-490.

Goldammer, T., Weikard, R., Brunner, R. M., and Schwerin, M. (1996). Generation of chromosome fragment specific bovine DNA sequences by microdissection and DOP-PCR. Mammalian Genome 7:291-296.

Goodfellow, P. N. (1987). Cystic fibrosis: classical and reverse genetics. Nature 326:824.

--- (1986). Duchenne muscular dystrophy; collaboration and progress. Nature 322:12-13.

Greulich, K. O. (1992). Chromosome microtechnology: microdissection and microcloning. TibTech 10:48-51.

Groh, S., González-de-Léon, D., Khairalla, M. M., Jiang, C., Bergvinson, D., Bohn, M., Hoisington, D. A., and Melchinger, A. E. (1998a). QTL mapping in tropical maize: III. Genomic regions for resistance to *Diatraea* spp. and associated traits in two RIL populations. Crop. Sci. 38: 1062-1072.

Groh, S., Khairallah, M. M., González-de-León, D., Willcox, M., Jiang, C., Hoisington, D. A., and Melchinger, A. E. (1998b). Comparison of QTLs mapped in RILs and their testcross progenies of tropical maize for insect resistance and agronomic traits. Plant Breeding 117: 193-202.

Guan, X. Y., Trent, J. M., and Meltzer, P. S. (1993). Generation of band-specific painting probes from a single microdissected chromosome. Hum. Mol. Genet. 2:1117-1121.

Gusella, J. F., Keys, C., Varsany-Breiner, A., Kao, F. T., Jones, C., Puck, T. T., and Housman, D. (1980). Isolation and localization of DNA segments from specific human chromosomes. Proc. Natl. Acad. Sci., USA 77:2829-2833.

Haenlin, M., Steller, H., Pirrotta, V., and Mohier, E. (1985). A 43 kilobase cosmid P transposon rescues the *fs(1)K10* morphogenetic locus and three adjacent *Drosophila* developmental mutants. Cell 40:827-837.

Hake, S. and Walbot, V. (1980). The genome of *Zea mays*, its organization and homology to related classes. Chromosoma 79:251-270.

Hanson, R. E., Zwick, M. S., Choi, S., Islam-Faridi, M. N., McKnight, T. D., Wing, R. A., Price, H. J., and Stelly, D. M. (1995). Fluorescent *in situ* hybridization of a bacterial artificial chromosome. Genome 38:646-651.

Heiskanen, M., Peltonen, L., and Palotie, A. (1996). Visual mapping by high resolution FISH. Trends in Genetics 12:379-382.

Helentjaris, T. (1995). Atlas of duplicated sequences in maize. Maize Genet. Coop. Newsl. 69: 67-81.

Helentjaris, T., Weber, D., and Wright, S. (1988). Identification of the genomic locations of duplicate nucleotide sequences in maize by analysis of restriction fragment length polymorphism. Genetics 118:353-363.

Henrich. J., Born, U., Ponelies, N., Stein, N., Stanke, M., Melchinger, A. E., and Weber, G. (1997). Physikalische Feinkartierung von Resistenzmarkern für Zünslerresistenz bei tropischem Mais (*Zea mays* L.). Vortr. Pflanzenzüchtung 38:79-95.

Hinderliter, D. G. (1983). Host plant resistance in two tropical maize, *Zea mays* L., populations to southwestern corn borer, *Diatraea grandiosella* Dyar, and the sugarcane borer, *D. saccharalis* F. Ph.D thesis: University of Wisconsin, Madison.

Hohmann, U., Endo, T. R., Gill, K. S., and Gill, B. S. (1994). Comparison of genetic and physical maps of group 7 chromosomes from *Triticum aestivum* L. Mol. Gen. Genet. 245:644-653.

Hoisington, D., Khariallah, M., and González-de-León, D. (1994). Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory. 2nd Edition, ed. CIMMYT, Mexico.

Hoisington, D., Jiang, C., Khairallah, M., Ribaut, J. M., Bohn, M., Willcox, M., and González-de-León, D. (1996) Prospects for marker assisted selection of complex traits in maize. Vortr. Pflanzenzüchtung 33: 50-56.

Hong, K. S., Richter, T. E., Bennetzen, J. L., and Hulbert, S. H. (1993). Complex duplications in maize lines. Mol. Gen. Genet. 239:115-121.

Jamilena, M., Garrido-Ramos, M., Ruiz Rejón, M., Ruiz Reón, C., and Parker, J. S. (1995). Characterisation of repeated sequences from microdissected B chromosomes of *Crepis capillaris*. Chromosoma 104.

Jampates, R. and Dvorak, J. (1986). Location of the Ph1 locus in the metaphase chromosome map and the linkage map of the 5Bq arm of wheat. Can J Genet Cytol 28:511-519.

Jewell, D. C. and Islam-Faridi, I. (1994). A technique for somatic chromosome preparation and C-banding of maize. S. 484-492. *In* Freeling, M. and Walbot, V. (ed.) The Maize Handbook. Springer-Verlag, New York, USA.

Jiang, J. and Gill, B. S. (1994). Chromosome painting of Amigo wheat. Theor. Appl. Genet. 89:811-813.

Jiang, J., Gill, B. S., Wang, G. L., Ronald, P. C., and Ward, D. C. (1995). Metaphase and interphase fluorescence *in situ* hybridization mapping of the rice genome with bacterial artifical chromosomes. Proc. Natl. Acad. Sci., USA 92:4487-4491.

Jiang, J., Hulbert, S. H., Gill, B. S., and Ward, D. C. (1996). Interphase fluorescence *in situ* hybridization mapping: a physical mapping strategy for plant species with large complex genomes. Mol. Gen. Genet. 252:497-502.

Johnson, D. H. (1990). Molecular cloning of DNA from specific chromosomal regions by microdissection and sequence-independent amplification of DNA. Genomics 6:243-251.

Jung, C., Claussen, U., Horsthemke, B., Fischer, F., and Herrmann, R. G. (1992). A DNA library from an individual *Beta patellaris* chromosome conferring nematode resistance obtained by microdissection of meiotic metaphase chromosomes. Plant Mol. Biol. 20:503-511.

Kao, F. T. (1996). Chromosome microdissection and microcloning: application to genome analysis. Jauhar, P. P., ed. Methods of genome analysis in plants. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press; 329-343.

Kao, F. T. (1993). Microdissection and microcloning of human chromosome regions in genome and genetic disease analysis. BioEssays 15:141-146.

Kao, F. T. and Yu, J. W. (1991). Chromosome microdissection and cloning in human genome and genetic disease analysis. Proc. Natl. Acad. Sci., USA 88:1844-1848.

Khairallah, M. M., Bohn, M., Jiang, C., Deutsch, J. A., Jewell, D. C., Mihm, J. A., Melchinger, A. E., González-de-Léon, D., and Hoisington, D. A. (1998). Molecular mapping of QTL for southwestern corn borer resistance, plant height and flowering in tropical maize. Plant Breeding 117: 309-318.

Kleine, M., Michalek, W., Graner, A., Herrmann, R. G., and Jung, C. (1993). Construction of a barley (*Hordeum vulgare* L.) YAC library and isolation of a *Hor1*-specific clone. Mol. Gen. Genet. 240:265-272.

Kranz, J., Schmutterer, H., and Koch, W. (1977). Diseases, pests, and weeds in tropical crops. Berlin, Hamburg, Germany: Verlag Paul Parey.

Lapitan, N. L. V., Brown, S. E., Kennard, W., Stephens, J. L., and Knudson, D. L. (1997). FISH physical mapping with barley BAC clones. The Plant Journal 11:149-156.

Lehfer, H., Busch, W., Martin, R., and Herrmann, R. G. (1993). Localization of the B-hordein locus on barley chromosomes using fluorescence *in situ* hybridization. Chromosoma 102:428-432.

Leitch, I. J. and Heslop-Harrison, J. S. (1993). Physical mapping of four sites of 5S rDNA sequences and one site of the alpha-amylase-2 gene in barley (*Hordeum vulgare*). Genome 36:517-523.

Levings, C. S. and Stuber, C. W. (1971). An oxidizable flavonoid difference in corn silks. Maize Genet. Coop. Newsl.. 45:156-160.

Leyser, O. and Chang, C. (1996). Chromosome walking. S. 247-274. *In* Foster, G. D. and Twell, D. (ed.) Plant Gene Isolation - Principles and Practice. John Wiley & Sons, Sussex, England.

Lichter, P., Cremer, T., Borden, J., Manuelidis, L., and Ward, D. C. (1988). Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by *in situ* suppression hybridization using recombinant DNA libraries. Human Genetics 80:224-234.

Lukaszewski, A. J. and Curtis, C. A. (1993). Physical distribution of recombination in B-genome chromosomes of tetraploid wheat. Theor Appl Genet 86:121-127.

Martin, G. B., Ganal, M. W., and Tanksley, S. D. (1992). Construction of a yeast artificial chromosome library of tomato and identification of cloned segments linked to two disease resistance loci. Mol Gen Genet 233:25-32.

Matise, T. C., Perlin, M., and Chakravarti, A. (1994). Automated construction of genetic linkage maps using an expert system (Multi Map): A human genome linkage map.

Nature Genet. 6:384-390.

Meltzer, P. S., Guan, X. Y., Su, Y. A., Gracia, E., and Trent, J. M. (1997). Identification of region specific genes by chromosome microdissection. Cancer Genet. Cytogenet. 93:29-32.

Meltzer, P. S., Guan, X. Y., Burgess, A., and Trent, J. M. (1992). Rapid generation of region specific probes by chromosome microdissection and their application. Nature Genetics 1:24-28.

Meltzer, P. S., Guan, X. Y., Zhang, J., and Trent, J. M. (1995). Microdissection and direct PCR amplification of human chromosomes. Human chromosomes - principles and techniques: Verma, Ram S., Babu, Arvind; 271-279.

Mihm, J. A. (1997). Evaluating maize for resistance to tropical stem borers, armyworms, and earworms. S.109-121. *In* Proc. Int. Symp. Methodologies for the developing host plant resistance to maize insects. El Batan, Mexico; 1987 Mar 9-1987 Mar 14; CIMMYT, El Batan, Mexico.

Newsham, I., Claussen, U., Lüdecke, H. J., Mason, M., Senger, G., Horsthemke, B., and Cavenee, W. (1991). Microdissection of chromosome band IIp15.5: Characterization of probes mapping distal to the *HBBC* Locus. Genes, Chromosomes & Cancer 3:108-116.

Orkin, S. H. (1986). Reverse genetics and human disease. Cell 47:845-850.

Pan, W. H., Houben, A., and Schlegel, R. (1993). Highly effective cell synchronization in plant roots by hydroxyurea and amiprophos-methyl or colchicine. Genome 36:387-390.

Panda, N. and Kush, G. S. (1995). Host plant resistance to insects. ed. Wallingford, UK: CAB International.

Pich, U., Houben, A., Fuchs, J., Meister, A., and Schubert, I. (1994). Utility of DOP-PCR amplified DNA from total genome and defined chromosome regions of the field bean. Mol. Gen. Genet. 243:173-177.

Pinkel, D., Landegent, J., Collins, C., Fuscoe, J., Segraves, R., Lucas, J., and Gray, J. (1988). Fluorescence *in situ* hybridization with human chromosome-specific libraries: Detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. Proc. Natl. Acad. Sci., USA 85:9138-9142.

Pirrotta, V., Hadfield, C., and Pretorius, G. H. J. (1983). Microdissection and cloning of the *white* locus and the 3B1-3C2 region of the *Drosophila* X chromosome. EMBO Journal 2:927-934.

Ponelies, N., Scheef, J., Köllner, M., Endlich, N., and Greulich, K. O. (1994). Analysis of DNA from a specific chromosome region. S. 102-123. *In* Bullerdiek, J. and Barnitzke, S. (ed.) Chromosome 12 aberrations in human solid tumors. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany.

Ponelies, N., Stein, N., and Weber, G. (1997). Microamplification of specific chromosome sequences; an improved method for genome analysis. Nucleic Acids Research 25:3555-3557.

Roman, H. (1948). Directed fertilization in maize. Proc. Nat. Acad. Sci, USA 34:36-42.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning - a laboratory manual. Cold Spring Habour Laboratory Press, USA.

Sandery, M. J., Forster, J. W., Macadam, S. R., Blunden, R., Jones, R. N., and Brown, S. D. M. (1991). Isolation of a sequence common to A- and B-chromosomes of rye (*Secale cereale*) by microcloning. Plant Mol. Biol. Rep. 9:21-30.

Saunders, R. D. C., Glover, D. M., Ashburner, M., Siden-Kiamos, I., Louis, C., Monastirioti, M., Savakis, C., and Kafatos, F. (1989). PCR amplification of DNA microdissected from a single polytene chromosome band: a comparison with conventional microcloning. Nucleic Acids Research 17:9027-9037.

Scalenghe, F., Turco, E., Edström, J. E., Pirotta, V., and Melli, M. (1981). Microdissection and cloning of DNA from a specific region of *Drosophila melanogaster* polytene chromosome. Chromosoma 82:205-216.

Schaff, D. A., Koehler, S. M., Matthews, B. F., and Bauchan, G. R. (1990). *In situ* hybridization of beta-Tubulin to alfalfa chromosomes. Journal of Heredity 81:480-483.

Schondelmaier, J., Martin, R., Jahoor, A., Houben, A., Graner, A., Koop, H. U., Herrmann, R. G., and Jung, C. (1993). Microdissection and microcloning of the barley (*Hordeum vulgare* L.) chromosome 1HS. Theor. Appl. Genet. 86:629-636.

Schwarz, D. C. and Cantor, C. R. (1984). Separation of yeast chromosomal size DNAs by pulsed field gel electrophoresis. Cell 37:67-75.

Sears, E. R. (1984). Mutations in wheat that raise the level of meiotic chromosome pairing. *In*:Gene manipulation in plant improvement, 16th Stadler Genetics Symposium Plenum Press, New York

Shen, D. L. and Wu, M. (1989). Transmission electron microscopic study of maize pachytene chromosome 6. Stain Technology 64:65-73.

Singh, R. J. (1993). Plant Cytogenetics. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, USA.

Snape, J. W., Flavell, R. B., O´Dell, M., Hughes, W. G., and Payne, P. I. (1985). Intrachromosomal mapping of the nucleolar organizer region relative to three marker loci on chromosome 1B of wheat (*Triticum aestivum*). Theor. Appl. Genet. 69:263-270.

Sonstegard, T. S., de León, A. P., Beattie, C. W., and Kappes, S. M. (1997). A chromosome-specific microdissected library increases marker density on bovine chromosome 1. Genome Research 7:76-80.

Southern, E. M. (1975). Detection of specific DNA sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98:503.

Spielvogel, H., Hennies, H. C., Claussen, U., Washington, S. S. C. A., and Reis, A. (1992). Band-specific localization of the microsatellite at D13S71 by microdissection and enzymatic amplification. Am. J. Hum. Genet. 50:1031-1037.

Stam, P. and Zeven, A. C. (1981). The theoretical proportion of the donor genome in near-isogenic lines of self-fertilizers bred by backcrossing. Euphytica 30: 227-238.

Stein, N. (1998). Erstellung segmentspezifischer DNA-Bibliotheken aus Pachytän-chromosomen zur Klonierung eines Gens für MDMV-Resistenz bei *Zea mays* (L.). Shaker Verlag, Aachen: Dissertation Universität Hohenheim.

Stein, N., Ponelies, N., Musket, T., McMullen, M., and Weber, G. (1998). Chromosome micro-dissection and region-specific libraries from pachytene chromosomes of maize (*Zea mays* L.). Plant Journal 13:281-289.

Telenius, H., Carter, N. P., Bebb, C., Nordenskjöld, M., Ponder, B. A., and Tunnacliffe, A. (1992). Degenerated oligonucleotide-primed PCR: General amplification of target DNA by a single degenerated primer. Genomics 13:718-725.

Van Daelen, R. and Zabel, P. (1992). Pulsed-field gel electrophoresis. S. 71-100. *In* Beckmann, J.S., and Osborn, T.C. (ed.) Plant genomes: methods for genetic and physical mapping. Kluwer Academic Publishers, Dodrecht, The Netherlands.

von Eggeling, F. and Spielvogel, H. (1995). Applications of random PCR. Cell. Mol. Biol. 41:653-670.

Wang, G.-L., Holsten, T. E., Song, W. Y., Wang, H. P., and Ronald, P. C. (1995). Construction of a rice bacterial artificial chromosome library and identification of clones linked to the *Xa-21* disease resistance locus. Plant Journal 7:525-533.

Wang, M. L., Leitch, A. R., Schwarzacher, T., Heslop-Harrison, J. S., and Moore, G. (1992). Construction of a chromosome-enriched HpaII library from flow-sorted wheat chromosomes. Nucleic Acids Research 20:1897-1901.

Weber, B. (1998) Entwicklung von Restriktionsendonuklease-Adaptor-Oligonukleotid-Kombinationen für PCR Amplifizierung von mikrodissektierten Chromosomen: Diplomarbeit Universität Hohenheim, Stuttgart.

Weber, J. L. and May, P. E. (1989). Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. Am. J. Hum. Genet. 44:388-396.

Weichenhan, D. (1991). Fast recovery of DNA from agarose gels by centrifugation through blotting paper. Trends in Genetics 7:109.

Woo, S.-S., Jiang, J., Gill, B. S., Paterson, A. H., and Wing, R. A. (1994). Construction and characterization of a bacterial chromosome library of *Sorghum bicolor*. Nucleic Acids Research 22:4922-4931.

Zhu, T., Liang, S., Funke, R. P., Gresshoff, P. M., and Keim, P. (1996). Characterization and application of soybean YACs to molecular cytogenetics. Mol. Gen. Genet. 252:483-488.

Zwick, M. S., Hanson, R. E., McKnight, T. D., Islam-Faradi, M. N., Stelly, D. M., Wing, R. A., and Price, H. J. (1997). A rapid procedure for the isolation of C_0t-*1* DNA from plants. Genome 40:138-142.

Curriculum vitae

Dipl. Agr.-Biol. Jürgen Henrich

* 21.12.1968 in Eberbach / Neckar

Schule

1975 - 1979	Grundschule in Neckarsteinach
1979 - 1988	Hohenstaufen-Gymnasium in Eberbach, Abschluß mit Abitur

Wehrdienst

10/1988 - 12/1989	Fernmeldeausbildungskompanie I/III in Koblenz 2./ Fernmeldebataillon 12 in Veitshöchheim

Studium

10/1989 - 09/1994	Studium der Agrarbiologie an der Universität Hohenheim Hauptfächer: Pflanzenzüchtung, Populationsgenetik, Pflanzenbau, Saatgutkunde und Keimungsphysiologie Diplomarbeit im Fach Pflanzenzüchtung: "Bestimmung der Regenerationseffizienz unreifer Embryonen bei *Zea mays* L. und Nachweis der Eignung dieser Embryonen zur Transformation" Abschluß: "Diplom-Agrarbiologe"

Promotion

11/1994 - 09/1998	Doktorand der Fakultät III (Agrarwissenschaften I), Universität Hohenheim, Stuttgart Erarbeitung der experimentellen Daten für die vorliegende Dissertation am Institut für Pflanzenzüchtung, Saatgutforschung und Populationsgenetik der Universität Hohenheim, Stuttgart

Praktische Tätigkeiten

06/1988 - 09/1988	Landwirtschaftliches Vorstudienpraktikum
02/1992 - 04/1992 und 08/1992	Biotechnologisches Praktikum am Forschungsschwerpunkt "Biotechnologie und Pflanzenzüchtung" der Universität Hohenheim mit Schwerpunkt Antherenkultur bei Roggen und Mais, sowie Zell- und Gewebekultur bei Weidelgras
07/1991 - 12/1993	Studentische Hilfskraft am Forschungsschwerpunkt "Biotechnologie und Pflanzenzüchtung" der Universität Hohenheim
07/1996 - 04/1998	Wissenschaftliche Hilfskraft bei der Systemverwaltung eines PC-Netzwerkes an der Universität Hohenheim
seit 10/1998	Wissenschaftlicher Angestellter als ´Manager High-Throughput Mapping´ bei der Firma LION bioscience AG, Heidelberg