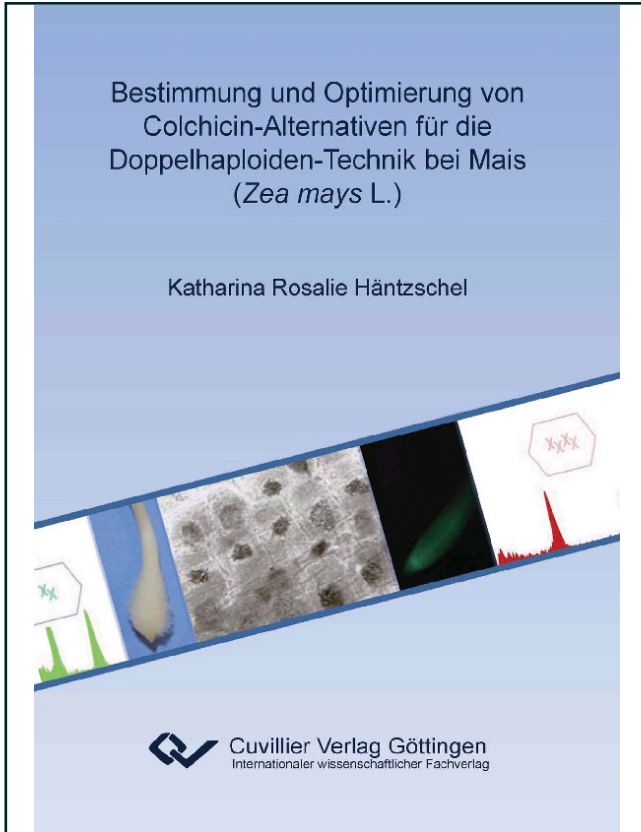




Katharina Rosalie Häntzschel (Autor)
Bestimmung und Optimierung von Colchicin-Alternativen für die Doppelhaploiden-Technik bei Mais (*Zea mays* L.)



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/278>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentzsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany
Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG.....	1
1.1 ALLGEMEINE EINLEITUNG	1
1.1.1 Botanik	1
1.1.2 Geschichte	1
1.1.3 Anbau und Verwendung von Mais	2
1.1.4 Maiszüchtung allgemein	3
1.2 LEBENSZYKLUS VON <i>ZEA MAYS</i> L. UND BILDUNG DER FOLGEGENERATION	3
1.3 ZELLZYKLUS	4
1.3.1 Ablauf und Phasen des Zellzyklus	4
1.3.2 Mitose.....	5
1.4 DOPPELHAPLOIDENTECHNIK	6
1.4.1 Kurze Geschichte der Doppelhaploidentechnik	6
1.4.2 Allgemeine Vorgehensweise	7
1.4.3 Erzeugung doppelhaploider Maispflanzen	8
1.4.3.1 Haploideninduktion	8
1.4.3.2 Aufregulierung des Chromosomensatzes.....	9
1.5 ZIEL DIESER ARBEIT	10
2. MATERIAL.....	11
2.1 PFLANZENMATERIAL.....	11
2.1.1 <i>Zea mays</i> L.	11
2.1.2 <i>Arabidopsis thaliana</i> cv. Columbia.....	12
2.2 CHEMIKALIEN.....	12
2.2.1 Einzelchemikalien.....	12
2.2.2 Chemikalien-Bibliothek	13
2.3 MEDIEN / PUFFER	14
2.4 GEBRAUCHSFERTIGE LÖSUNGEN	15
2.5 GERÄTE / VERBRAUCHSMATERIAL / SOFTWARE	15

3. METHODEN.....	18
3.1 STANDARD-METHODEN	18
3.1.1 Sterilisation von Medien, Lösungen und ddH ₂ O	18
3.1.2 Umgang mit transgenem Pflanzenmaterial	18
3.1.2.1 Transgener Mais	18
3.1.2.2 Tansgene <i>Arabidopsis</i>	19
3.1.3 Entsorgung von Chemikalien.....	19
3.2 KEIMUNG UND VERMEHRUNG VON SAATGUT.....	19
3.2.1 Keimung und Vermehrung von Maissaatgut	19
3.2.1.1 Keimung von Maissaatgut.....	19
3.2.1.2 Vermehrung von Maissaatgut	20
3.2.2 Keimung und Vermehrung von Arabidopsissaatgut	21
3.2.2.1 Saatgut-Sterilisation	21
3.2.2.2 Saatgut-Vermehrung.....	22
3.2.2.3 Übertragung und Keimung von Arabidopsissaatgut in 96-Well Platten.....	23
3.3 BEHANDLUNG DES WURZELSPITZENMERISTEMS VON MAISKEIMLINGEN MIT POTENZIELLEN ... COLCHICIN-ALTERNATIVEN	24
3.3.1 Allgemeine Vorgehensweise	24
3.3.2 Behandlung mit Chemikalien	24
3.3.3 Behandlung mit physikalischen Methoden.....	27
3.3.3.1 Behandlung bei erhöhtem atmosphärischem Druck	27
3.3.3.2 Behandlung im elektrischen Feld	28
3.3.3.3 Behandlung bei Temperaturextremen	28
3.4 METHODEN ZUR ERZEUGUNG VON MAISPFLANZEN MIT AUFREGULIERTEM	29
CHROMOSOMENSATZ	29
3.4.1 Vorbehandlung des Maissaatguts / der Maiskeimlinge	29
3.4.1.1 Ansätze zur synchronen Keimung des Saatguts	29
3.4.1.2 Verletzen.....	30
3.4.1.3 Vakuum.....	30
3.4.2 Behandlung von Maissaatgut	30
3.4.3 Behandlung von Maiskeimlingen	31
3.4.3.1 Inkubation auf Keimprüfpapier	31
3.4.3.2 Direkte Inkubation im Inhibitor - Flasche	31
3.4.3.3 Direkte Inkubation im Inhibitor mit Belüftung - RITA-System	31
3.5 AUSWERTUNG DER MITOSEINHIBITION.....	32
3.5.1 Qualitative Auswertung am Mikroskop.....	32
3.5.1.1 Aufbau des Mikroskops.....	32
3.5.1.2 Herstellung von Wurzelspitzen-Präparaten	32
3.5.1.3 Bestimmung der Mitoserate	33

3.5.2	Quantitative Auswertung am Durchflusszytometer.....	33
3.5.2.1	Prinzip der Durchflusszytometrie.....	33
3.5.2.2	Zur Bestimmung des Ploidiegrades eingesetztes Pflanzenmaterial.....	34
3.5.2.3	Probenaufbereitung.....	35
3.5.2.4	Ablauf der Messung	36
3.5.3	Morphologische Charakterisierung von Pflanzen, die mit Inhibitor behandelt..... wurden	37
3.6	ERMITTLUNG WEITERER COLCHICIN-ALTERNATIVEN MITTELS HOCHDURCHSATZ- SCREENING DER LATCA-BIBLIOTHEK	37
3.6.1	Behandlung von <i>A. thaliana</i> Keimlingen mit LATCA-Substanzen.....	38
3.6.2	Auswertung der LATCA-Platten.....	39
3.7	UNTERSUCHUNG DER HAPLOIDENINDUKTION	40
4.	ERGEBNISSE.....	42
4.1	ERMITTLUNG VON POTENZIELLEN COLCHICIN-ALTERNATIVEN DURCH BEHANDLUNG VON..... MAIS-WURZELSPITZEN	42
4.1.1	Behandlungsparameter und qualitative Auswertung am Mikroskop	42
4.1.1.1	Bestimmung einer geeigneten Positivkontrolle	43
4.1.1.2	Qualitative Bewertung der potenziellen Alternativ-Chemikalien und	
	Bestimmung der optimalen Inkubationsbedingungen	45
4.1.1.3	Qualitative Bewertung der physikalischen Methoden und Bestimmung der..... optimalen Inkubationsbedingungen.....	46
4.1.2	Quantitative Bewertung der möglichen Alternativ-Behandlungen aus 4.1.1	47
4.1.2.1	Chemikalien	48
4.1.2.2	Physikalische Methoden	49
4.1.3	Optimierungsversuche.....	51
4.1.3.1	Optimale Konzentration und optimale Inkubationszeit.....	51
4.1.3.2	Zugabe von Detergenzien	53
4.1.3.3	Synchronisation	54
4.1.3.4	Kombinationen	55
4.1.4	Überprüfung potenzieller Colchicin-Alternativen	57
4.2	BEHANDLUNG VON MAISKEIMLINGEN MIT COLCHICIN-ALTERNATIVEN (AUS 4.1).....	58
4.2.1	Versuche zur Optimierung der Inkubationsbedingungen.....	59
4.2.1.1	Vorbehandlung des Maissaatguts / der Maiskeimlinge	59
4.2.1.2	Behandlung von Maissaatgut - Keimversuche.....	60
4.2.1.3	Vergleich von Inkubationsmethoden	62
4.2.2	Optimierung der Keimlingsbehandlung im RITA-System	64
4.2.2.1	Schnelltest zur Überprüfung der RITA-Behandlung mittels SAM-Messung	64
4.2.2.2	Bestimmung des optimalen Inkubationszeitpunktes	64

4.2.2.3 Vergleich von Belüftungszeiträumen	65
4.2.3 Behandlung von Haploiden.....	66
4.2.3.1 Behandlung haploider Keimlinge mit Colchicin-Alternativen	66
4.2.3.2 Optimierungsversuche zur Behandlung mit APM	68
4.3 ERMITTLUNG WEITERER COLCHICIN-ALTERNATIVEN MITTELS SCREENING DER LATCA- BIBLIOTHEK	71
4.3.1 Ermitteln der optimalen Screeningparameter.....	71
4.3.1.1 Übertragung und Keimung von Arabidopsissaatgut in 96-Well Platten.....	71
4.3.1.2 Bestimmung des Tausendkorngewichts von Arabidopsissaatgut	71
4.3.1.3 Überprüfung des Screening-Merkmals (GFP-Fluoreszenz).....	71
4.3.2 Durchführung des LATCA-Screenings.....	72
4.3.2.1 Erste Screening-Stufe	73
4.3.2.2 Zweite Screening-Stufe.....	75
4.3.2.3 Dritte Screening-Stufe.....	76
4.4 UNTERSUCHUNG DES MECHANISMUS DER HAPLOIDENINDUKTION	79
5. DISKUSSION	82
5.1 BESTIMMUNG MÖGLICHER COLCHICIN-ALTERNATIVEN DURCH DIE BEHANDLUNG VON..... MAISWURZELN.....	82
5.2 BEHANDLUNG VON MAISKEIMLINGEN MIT COLCHICIN-ALTERNATIVEN.....	86
5.3 HOCHDURCHSATZ-SCREENING EINER CHEMIKALIEN-BIBLIOTHEK ZUR ERMITTLUNG	90
WEITERER COLCHICIN-ALTERNATIVEN.....	90
5.4 UNTERSUCHUNG DES MECHANISMUS DER HAPLOIDENINDUKTION	91
5.5 SCHLUSSFOLGERUNG	92
6. ZUSAMMENFASSUNG	93
6. SUMMARY	95
7. QUELLEN	97
8. ANHANG	108