



Barbara Rudolph (Autor)

Entwicklung, Charakterisierung und genetische Kartierung von Mikrosatelliten-Markern beim Raps

Barbara Rudolph

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



Cuvillier Verlag Göttingen

<https://cuvillier.de/de/shop/publications/3436>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>

Inhaltsverzeichnis

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

II

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

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

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