

4545 - 854 9

**Mikrosatelliten bei der Zuckerrübe (*Beta vulgaris* L.)  
und ihre Verwendung als molekulare Marker**

Von dem Fachbereich Biologie  
der Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades eines

**Doktors der Naturwissenschaften**

- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biol. René Groben

geboren am 03.03.1968 in Bremerhaven

1998



# Inhaltsverzeichnis

<b><u>I. Einleitung</u></b>	<b>1</b>
<b>1. Die Definition des Begriffes "Mikrosatelliten"</b>	<b>1</b>
<b>2. Mikrosatelliten als molekulare Marker</b>	<b>3</b>
<b>3. Verwendung molekularer Marker bei der Zuckerrübe</b>	<b>6</b>
<b>4. Aufgabenstellung dieser Arbeit</b>	<b>7</b>
<b><u>II. Material &amp; Methoden</u></b>	<b>9</b>
<b>1. Isolierung von Mikrosatelliten aus dem Genom von <i>B. vulgaris</i></b>	<b>9</b>
1.1. Erstellung einer gröÙenselektierten genomischen Bank .....	9
1.1.1. Isolierung genomischer DNA aus <i>B. vulgaris</i> .....	9
1.1.2. Größenfraktionierung der DNA .....	10
1.1.3. Ligation der Zuckerrüben-DNA mit pBluescript .....	11
1.1.4. Transformation in <i>E. coli</i> "Sure" .....	12
1.2. Untersuchung der genomischen Bank auf Mikrosatelliten .....	13
1.2.1. Herstellung von Filtern für die Koloniehybridisierung .....	13
1.2.2. Auswahl der Sonden für die Hybridisierung .....	13
1.2.3. Radioaktive Hybridisierung .....	15
1.2.3.1. Markierung der Sonden mit [ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]dATP .....	15
1.2.3.2. Hybridisierung der Filter .....	15
1.2.3.3. Waschen der Filter und Autoradiographie .....	16
1.2.4. Nicht-radioaktive Hybridisierung .....	16
1.2.4.1. Markierung der Sonden mit Digoxigenin (DIG) .....	16
1.2.4.2. Hybridisierung der Filter .....	17
1.2.4.3. Waschen der Filter, Detektion und Autoradiographie .....	18

1.3. Isolierung mikrosatelliten-tragender Plasmidklone .....	19
1.3.1. Isolierung positiver Klone und Miniprep der Plasmide .....	19
1.3.2. Überprüfung der Plasmide durch Southern Blots .....	19
1.4. Sequenzierung positiver Klone .....	20
1.4.1. Isolierung von Plasmiden über Quiagen-Säulen .....	20
1.4.2. Manuelle Sequenzierung .....	20
1.4.3. Automatische Sequenzierung .....	21
<b>2. Suche nach Mikrosatelliten in Sequenzen aus Computerdatenbanken</b>	<b>22</b>
2.1. Suche nach Sequenzen der Familie <i>Chenopodiaceae</i> .....	22
2.2. Untersuchung der Sequenzen auf Mikrosatelliten .....	22
<b>3. Homologievergleich der isolierten Klone mit Datenbank-Sequenzen</b>	<b>23</b>
<b>4. Untersuchung auf Mikrosatelliten-Polymorphismen mit Hilfe der PCR</b>	<b>24</b>
4.1. Auswahl geeigneter Primer für die PCR .....	24
4.2. Auswahl und Vorbereitung des Untersuchungsmaterials .....	24
4.2.1. Pflanzenmaterial .....	24
4.2.2. Isolierung von DNA für die PCR (CTAB-Schnellmethode) .....	28
4.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	29
4.3.1. Optimierung der Reaktionsbedingungen .....	29
4.3.2. PCR-Bedingungen .....	32
4.4. Auftrennung der PCR-Produkte mit verschiedenen Gelsystemen .....	33
4.4.1. Hochauflösende Agarose (MetaPhor™) .....	33
4.4.2. Denaturierende und nichtdenaturierende Polyacrylamid- gelelektrophorese (PAGE) .....	34
<b>5. Auswertung der detektierten Polymorphismen</b>	<b>35</b>
5.1. Bestimmung der Allelzahl und -größe .....	35
5.1.1. Elektrophoretische Größenbestimmung .....	35
5.1.2. Klonierung und Sequenzierung ausgewählter Allele .....	35
5.2. Berechnung des PIC-Wertes der Allele .....	36
5.3. Kartierung von Mikrosatelliten-Markern in spaltenden Populationen .....	36
<b>6. Bestimmung des Polymorphiegrades weiterer Markersysteme</b>	<b>37</b>
6.1. Isoenzymuntersuchungen .....	37
6.2. RAPD-Untersuchungen .....	37

### III. Ergebnisse

39

<b>1. Vorkommen von Mikrosatelliten in einer gröbenselektierten genomischen Plasmidbank von <i>Beta vulgaris</i></b>	<b>39</b>
1.1. Isolierung von Mikrosatelliten aus dem Genom der Zuckerrübe .....	39
1.1.1. Erstellung der genomischen Bank .....	39
1.1.2. Vergleich radioaktiver und nicht-radioaktiver Techniken .....	40
1.1.3. Auswahl der Sonden und Nomenklatur der Klone .....	42
1.1.4. Sequenzierung positiver Klone .....	43
1.2. Auftreten verschiedener Mikrosatelliten-Motive .....	44
1.2.1. Ergebnisse der Sequenzierungen .....	44
1.2.2. Frequenz der gefundenen Mikrosatelliten-Motive .....	45
1.2.3. Sequenzuntersuchungen der mikrosatelliten-enhaltenden Klone .....	46
1.3. Vorkommen eines hochpolymorphen Mikrosatelliten innerhalb einer Satelliten-DNA .....	47
<b>2. Vorkommen von Mikrosatelliten in Sequenzen der <i>Chenopodiaceae</i> aus Computerdatenbanken</b>	<b>53</b>
2.1. Suche nach Sequenzen der <i>Chenopodiaceae</i> in Computerdatenbanken und den in ihnen enthaltenen Mikrosatelliten .....	53
2.2. Lokalisation der Mikrosatelliten in Sequenzen der <i>Chenopodiaceae</i> .....	56
2.2.1. Frequenz der verschiedenen Mikrosatelliten-Motive .....	56
2.2.2. Mikrosatelliten in kodierenden und nicht-kodierenden Bereichen .....	58
2.2.3. Mikrosatelliten in Organellen-Genomen .....	60
2.2.4. Redundante Sequenzen .....	61
<b>3. Polymorphiegrad von Mikrosatelliten innerhalb der Gattung <i>Beta</i></b>	<b>62</b>
3.1. Optimierung der Versuchsbedingungen für die Untersuchung von Mikrosatelliten-Polymorphismen .....	62
3.1.1. Auswahl der mikrosatelliten-flankierenden Primer und Optimierung der PCR-Bedingungen .....	62
3.1.2. Vergleich unterschiedlicher Trennsysteme für die Analyse von Mikrosatelliten-Allelen .....	66
3.2. Bestimmung der Anzahl und Größe der Mikrosatelliten-Allele .....	67

3.3. Polymorphismen von Mikrosatelliten in verschiedenen Populationen von <i>Beta vulgaris</i> .....	70
3.3.1. Polymorphismen von Mikrosatelliten in drei verschiedenen Kartierungspopulationen.....	70
3.3.2. Linien und aktuelles Zuchtmaterial .....	75
3.3.3. Sorten.....	78
3.3.4. Subspezies (Futterrübe, Mangold, Rote Beete).....	79
3.3.5. Wildarten.....	81
3.4. Berechnung des PIC-Wertes von Mikrosatelliten-Markern.....	87
3.5. Vergleich von Mikrosatelliten-Markern mit anderen Markersystemen .....	91
<b>4. Übertragbarkeit von Mikrosatelliten-Markern zwischen verschiedenen Gattungen</b> .....	<b>94</b>
4.1. Versuch der Optimierung der PCR-Bedingungen für den Einsatz von Mikrosatelliten in anderen Spezies .....	94
4.2. Einsatz von Mikrosatelliten aus verschiedenen Pflanzenarten bei der Untersuchung der Zuckerrübe.....	95
4.2.1. Spinat ( <i>Spinacia oleracea</i> ).....	95
4.2.2. Graumelde ( <i>Atriplex nummularia</i> ).....	99
4.2.3. Möhre ( <i>Daucus carota</i> ).....	100
4.2.4. Gerste ( <i>Hordeum vulgare</i> ).....	101
4.2.5. Weizen ( <i>Triticum aestivum</i> ).....	102
4.2.6. Roggen ( <i>Secale cereale</i> ).....	103
4.3. Einsatz von Mikrosatelliten-Markern der Zuckerrübe in verwandten Spezies.....	105
4.3.1. Spinat ( <i>Spinacia oleracea</i> ).....	105
4.3.2. Roter Gänsefuß ( <i>Chenopodium rubrum</i> ).....	106

#### IV. Diskussion

109

<b>1. Auswahl von Mikrosatelliten-Motiven für den Einsatz als molekulare Marker</b> .....	<b>109</b>
1.1. Vorkommen von Mikrosatelliten in pflanzlichen Genomen .....	109
1.2. Mikrosatelliten in Sequenzen aus Computerdatenbanken .....	115
1.3. Polymorphiegrad verschiedener Mikrosatelliten-Motive .....	117
<b>2. Methodische Aspekte der Mikrosatelliten-Analyse</b> .....	<b>118</b>
<b>3. Polymorphiegrad von Mikrosatelliten aus <i>B. vulgaris</i> und <i>S. oleracea</i></b> .....	<b>122</b>
3.1. Polymorphiegrad von Mikrosatelliten in unterschiedlichen Populationen .....	122
3.2. Vergleich des Polymorphiegrades von Mikrosatelliten mit dem anderer Markersysteme.....	127
<b>4. Einsatzmöglichkeiten von Mikrosatelliten-Markern bei der Zuckerrübe</b> .....	<b>129</b>
<b>5. Übertragbarkeit von Mikrosatelliten-Markern zwischen verschiedenen Populationen und Spezies</b> .....	<b>133</b>

#### V. Zusammenfassung

142

#### VI. Literatur

145

#### VII. Anhang

161