

Aus dem Institut für
Pflanzenzüchtung, Saatgutforschung und Populationsgenetik
der Universität Hohenheim
Fachgebiet: Populationsgenetik
Prof. Dr. H. H. Geiger

Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung
Gatersleben
Abt. Cytogenetik, AG Gen- und Genomkartierung
Dr. habil. M. Ganal

**Entwicklung, Charakterisierung und Kartierung
von Mikrosatellitenmarkern bei
der Zuckerrübe (*Beta vulgaris* L.)**

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Agrarwissenschaften
der Fakultät III - Agrarwissenschaften I
Pflanzenproduktion und Landschaftsökologie
der Universität Hohenheim

von
Diplom-Agrarbiologe
Jost Dörnte
aus Lutterbeck am Solling

2001

Die vorliegende Arbeit wurde am 12.09.2001 von der Fakultät III - Agrarwissenschaften I (Pflanzenproduktion und Landschaftsökologie) - der Universität Hohenheim als "Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Agrarwissenschaften" angenommen.

Tag der mündlichen Prüfung: 22.10.2001

Dekan:

Prof. Dr. Stahr

Berichterstatter, 1. Prüfer:

Prof. Dr. H.H. Geiger

1. Mitberichterstatter, 2. Prüfer:

Prof. Dr. Geldermann

2. Mitberichterstatter, 3. Prüfer:

Dr. habil. M. Ganal (IPK-Gatersleben)

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------|--|
| A | Adenin |
| AFLP | Amplified fragment length polymorphism |
| bp | Basenpaar(e) |
| BSA | Bovine serum albumin |
| C | Cytosin |
| Chr. | Chromosom |
| cM | CentiMorgan |
| CR | Cercosporaresistenz |
| CTAB | Cetyltrimethylammonium bromide |
| dATP | Desoxy Adenosintriphosphat |
| dCTP | Desoxy Cytosintriphosphat |
| dGTP | Desoxy Guanintriphosphat |
| Dist | Distanz |
| dTTP | Desoxy Thymintriphosphat |
| DH | Doppelhaploid |
| DNA | Deoxyribonucleic acid |
| DTT | Dithiothreitol |
| EDTA | Ethylenediaminetetraacetic acid |
| G | Guanin |
| g | Erdbeschleunigung, Gramm |
| GZM | Gaterslebener Zuckerrüben Mikrosatellit (Dinukleotid-Motiv) |
| GZMT | Gaterslebener Zuckerrüben Mikrosatellit (Trinukleotid-Motiv) |
| H ₂ Odd | Wasser deionisiert und autoklaviert |
| ISSR | Inter simple sequence repeat |
| kan | Kanamycin |
| kb | Kilobasenpaare |
| KWS | Kleinwanzlebener Saatzucht |
| max. | Maximum |
| Mbp | Megabasenpaare |
| min. | Minimum |
| MP-PCR | Microsatellite-primed PCR |
| n | Anzahl |
| PCR | Polymerase chain reaction |
| PIC | Polymorphism information content |
| QTL | Quantitative trait locus (oder loci) |
| RAMP | Random amplification of microsatellite polymorphism |

Fortsetzung Abkürzungsverzeichnis:

| | |
|----------------|--|
| RAPD | Random amplified polymorphic DNA |
| RFLP | Restriction fragment length polymorphism |
| S ₂ | Zweite Selbstungsgeneration |
| S ₄ | Vierte Selbstungsgeneration |
| SDS | Sodium dodecyl sulfate |
| SSR | Simple sequence repeat |
| STS | Sequence tagged site |
| T | Thymin |
| TBE | Tris-Borat-EDTA |
| T _M | Melting temperature (Schmelztemperatur der DNA) |
| Tris | Trishydroxymethylaminomethan |
| U | Unit |
| UPGMA | Unweighted pair-group method with arithmetic average |
| v | Volume |
| w | Weight |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Mikrosatelliten als molekulare Marker | 1 |
| 1.2 Die Zuckerrübe als Nutzpflanze und genetisches Objekt | 3 |
| 1.3 Frage- und Aufgabenstellungen dieser Arbeit | 6 |
| | |
| 2 Material und Methoden | 8 |
| 2.1 Entwicklung der Mikrosatellitenmarker | 8 |
| 2.1.1 Überblick | 8 |
| 2.1.2 Erstellung einer genomischen Phagenbank | 10 |
| 2.1.3 Sichtung der Bank auf Mikrosatelliten | 12 |
| 2.1.4 Sequenzierung der positiven Klone | 15 |
| 2.1.5 Selektion, Homologievergleiche und Ableiten der Primersequenzen | 16 |
| 2.1.6 Benennung der Marker | 17 |
| 2.2 PCR-Reaktion und Fragmentanalyse | 18 |
| 2.2.1 DNA-Isolierung für PCR | 18 |
| 2.2.2 PCR-Reaktionsbedingungen | 18 |
| 2.2.3 Fragmentanalyse und -auswertung | 19 |
| 2.3 Untersuchung der Mikrosatellitenmarker auf Funktion und Polymorphiegrad | 21 |
| 2.3.1 Funktionstest der Primerpaare | 21 |
| 2.3.2 Bestimmung des Polymorphiegrades der Mikrosatellitenmarker | 21 |
| 2.3.2.1 Pflanzenmaterial, RFLP- und AFLP-Markerdaten | 21 |
| 2.3.2.2 Ermittlung der Anzahl Allele und der PIC-Werte | 23 |
| 2.3.2.3 Klusteranalyse | 24 |
| 2.4 Kartierung der Mikrosatellitenmarker | 26 |
| 2.4.1 Die Kartierungspopulationen | 26 |
| 2.4.2 Kartierung mit MAPMAKER | 26 |

| | |
|---|----|
| 3 Ergebnisse | 28 |
| 3.1 Eigenschaften der genomischen Phagenbanken | 28 |
| 3.2 Vorkommen von Mikrosatelliten im Genom von <i>Beta vulgaris</i> | 29 |
| 3.3 Effizienz der Markerentwicklung | 30 |
| 3.4 Charakterisierung der funktionalen Mikrosatellitenmarker | 32 |
| 3.5 Polymorphiegrad | 35 |
| 3.6 Polymorphievergleich zwischen Mikrosatelliten-, RFLP- und AFLP-Markern | 39 |
| 3.7 Genetische Kartierung | 43 |
| 4 Diskussion | 47 |
| 4.1 Markerentwicklung | 47 |
| 4.1.1 Methode der Mikrosatellitenisolierung | 47 |
| 4.1.2 Abundanzen der Mikrosatellitenmotive im Vergleich zu anderen Pflanzenarten | 48 |
| 4.1.3 Effizienz der Markerentwicklung | 52 |
| 4.2 Charakterisierung | 56 |
| 4.3 Polymorphiegrad | 58 |
| 4.4 Markervergleich | 63 |
| 4.5 Genomische Verteilung der Mikrosatelliten | 66 |
| 4.6 Einsatz von Mikrosatellitenmarkern in der Pflanzenzüchtung | 69 |
| 4.7 Methodische Aspekte in der Routineanwendung | 71 |
| 5 Zusammenfassung | 73 |
| 6 Literaturverzeichnis | 75 |
| 7 Anhang | 85 |

1 Einleitung

1.1 Mikrosatelliten als molekulare Marker

Als Mikrosatelliten oder auch Simple Sequence Repeats (SSR) oder Short Tandem Repeats (STR) werden DNA-Abschnitte bezeichnet, die sich aus mehrfach wiederholten kurzen DNA Sequenzen zusammensetzen (HAMADA et al. 1982, LITT und LUTY 1989). Sequenzmotive sind zum Beispiel $(A)_n$, $(GT)_n$, $(GA)_n$ oder $(TGA)_n$. Die Abgrenzung von Mikrosatelliten zu sogenannten Minisatelliten ist nicht eindeutig. Als Mikrosatelliten werden meist Wiederholungen mit Einheiten aus einer bis fünf Basenpaaren bezeichnet. Bei Minisatelliten sind diese Grundeinheiten bis zu 100 bp groß. Auch Minisatelliten können als molekulare Marker genutzt werden (WONG et al. 1987). Wiederholungseinheiten von mehr als 100 bp nennt man dann Satelliten-DNAs. Einen Überblick über die Definition verschiedener repetitiver Elemente gibt TAUTZ (1993). Dabei zeigen diese ganz unterschiedliche Funktionen und Verteilungen in den eukariotischen Genomen. Die größeren Satelliten DNAs kommen hauptsächlich in den heterochromatischen Zentromer-Bereichen und den Telomer- und Subtelomer-Bereichen vor (ROYLE et al. 1988). Dagegen sind Mikrosatelliten gleichmäßig im Genom verteilt (TAUTZ und RENZ 1984). Über die genaue Funktion von Mikrosatelliten im Genom ist bisher nicht viel bekannt. Es gibt Vermutungen, daß sie zur Ausbildung bestimmter Sekundärstrukturen während der Replikation und Transkription (VALLE 1993) oder aber als Bindungsstellen für regulatorische Proteine (EPPLEN et al. 1996) nötig sind. Es ist jedoch auch möglich, daß sie keinerlei Funktion haben (TAUTZ 1989).

Auch in Organellen-DNA kommen Mikrosatelliten vor (POWELL et al. 1996). Da diese überwiegend ohne Rekombination und nur maternal vererbt werden, können Mikrosatellitenmarker aus Mitochondrien bei Tieren und aus Chloroplasten bei Pflanzen (CATO und RICHARDSON 1996, MCCAULEY 1995) für Populationsstudien eingesetzt werden. In Kombination mit kerngenomischen Mikrosatellitenmarkern liefern sie hier wichtige Informationen. Im Vergleich zu kerngenomischen Mikrosatelliten haben die Organellen-Mikrosatelliten allerdings nur eine geringe Bedeutung als molekulare Marker.

In Bezug auf die Häufigkeit von Mikrosatelliten gibt es Unterschiede zwischen Pflanzen und Wirbeltieren. LAGERCRANTZ et al. (1993) fanden in pflanzlichen Datenbanksequenzen einen Mikrosatelliten pro 29 kb. Bei Wirbeltieren sind Mikrosatelliten fünfmal häufiger.

Das (AT)_n-Motiv ist bei Pflanzen das häufigste. Bei Wirbeltieren ist es (GT)_n (LAGERCRANTZ et al. 1993). Nach WEBER (1990) lassen sich Mikrosatelliten entsprechend ihrer Struktur in vier Klassen einteilen. Dies sind perfekte, imperfekte, zusammengesetzte perfekte und zusammengesetzte imperfekte Mikrosatelliten. Bei perfekten Mikrosatelliten sind die Sequenzwiederholungen nicht durch andere Basenabfolgen unterbrochen. Dies ist der Fall bei imperfekten Mikrosatelliten. Perfekte oder imperfekte Mikrosatelliten können außerdem noch aus mehreren verschiedenen Motiven zusammengesetzt sein.

Mikrosatelliten zeichnen sich dadurch aus, daß sie durch eine unterschiedliche Anzahl an Wiederholungseinheiten in der Länge variieren (TAUTZ und RENZ 1984). Durch diese Eigenschaft sind sie als molekulare Marker geeignet. Der Längenpolymorphismus der Allele entsteht vermutlich durch das sogenannte "slippage" der DNA-Polymerase während der Replikation (TAUTZ et al. 1986, LEVINSON und GUTMAN 1987, TAUTZ und SCHLÖTTERER 1994). Durch die Polymerase Kettenreaktion (PCR: polymerase chain reaction) (MULLIS et al. 1986) lassen sich die Längenpolymorphismen sehr gut detektieren. Als häufigste Methode werden einzelne Mikrosatelliten durch spezifische Primer aus den flankierenden Sequenzen amplifiziert. Für diese Amplifizierung von Mikrosatelliten benötigt man die flankierenden Sequenzen. Diese kann man durch das Suchen nach Mikrosatellitenmotiven in Datenbanken oder aber durch die Isolierung aus einer genomischen Bank erhalten. Andere auf Mikrosatelliten basierende Methoden detektieren Polymorphismen unspezifisch in den flankierenden Bereichen von Mikrosatelliten. Hierzu gehören zum Beispiel MP (microsatellite-primed)-PCR (Beispiel: WEISING et al. 1995), ISSR (inter simple sequence repeat)-Amplifikation (Beispiel: PROVAN et al. 1996a) oder RAMP (random amplification of microsatellite polymorphism) (Beispiel: WU et al. 1994).

Die aus Mikrosatelliten entwickelten spezifischen Marker zeigen einen hohen Polymorphiegrad, sind multiallelisch und werden kodominant vererbt (RAFALSKI et al. 1996). Durch die hohe Anzahl verfügbarer Marker und ihre gleichmäßige Verteilung im Genom sind sie zum Aufbau von genetischen Kopplungskarten gut geeignet. Auf Mikrosatellitenmarkern basierende genetische Karten wurden zuerst für den Menschen (WEISSENBACH 1992) und die Maus (DIETRICH et al. 1992) erstellt. Aber auch bei Kulturpflanzen wurden Mikrosatellitenmarker bereits zur Erstellung genetischer Karten genutzt. Gut abgesättigte Karten gibt es bei Reis (AKAGI et al. 1996), Mais (SENIOR et al. 1996, TARMINO und TINGEY 1996), Weizen (RÖDER et al. 1998) oder Kartoffel (MILBOURNE et al. 1998). Beispiele für die Anwendung von Mikrosatellitenmarkern sind Fingerprint-Untersuchungen (TARMINO und TINGEY 1996, DIWAN

und CREGAN 1997) oder markergestützte Selektion (MAS) (BLAIR und MCCOUCH 1997). Einen Überblick über die Anwendungen molekularer Marker in der Pflanzenzüchtung geben MOHAN et al. (1997). Allgemein sind die Einsatzmöglichkeiten von Mikrosatellitenmarkern die gleichen wie bei anderen Markerarten. Mikrosatellitenmarker zeigen dabei allerdings einige wesentliche Vorteile. Dazu gehören die schon erwähnte kodominante Vererbung und der hohe Polymorphiegrad. Außerdem sind die Polymorphismen über die PCR leicht erfaßbar und damit gut zu automatisieren. Durch die spezifischen Primer können Ergebnisse aus verschiedenen Laboratorien leicht verglichen werden.

1.2 Die Zuckerrübe als Nutzpflanze und genetisches Objekt

Die Zuckerrübe (*Beta vulgaris* L.) gehört zusammen mit den Kulturpflanzen Mangold, Rote Bete und Futterrübe zur Familie der *Chenopodiaceae*, der Gattung *Beta* und der Sektion *Beta* (LANGE et al. 1999). Zu der Gattung *Beta* gehören außerdem noch die Sektionen *Corollinae*, *Nanae* und *Procumbentes*. Die Sektion *Beta* ist im gesamten Mittelmeerraum und an der europäischen Atlantikküste verbreitet. Der phylogenetische Ursprung der Gattung *Beta* wird im östlichen Mittelmeerraum vermutet. Die Zuckerrübe ist eine der jüngsten Kulturpflanzen. Vor 250 Jahren begannen A. S. Marggraf und später sein Schüler F. C. Achard mit der Selektion zuckerreicher Futterrüben. Einen Überblick über die historische Entwicklung gibt BECKER (1993). Heute werden etwa 40% der weltweiten Zuckerproduktion aus Zuckerrübe gewonnen. Bei den dabei angebauten Sorten handelt es sich fast ausschließlich um Hybridsorten (SMITH 1987). Diese wurden durch die Entdeckung einer cytoplasmatisch-genischen Sterilität (OWEN 1945) möglich. Große Zuchterfolge wurden in der Vergangenheit beim bereinigten Zuckerertrag gemacht. Dieser setzt sich aus dem Zuckergehalt, dem Rübenenertrag und dem Gehalt an Nichtzuckerstoffen (α -Aminostickstoff, Na^+ - und K^+ -Ionen) zusammen. In Mitteleuropa liegt der durchschnittliche Zuckergehalt des Rübenkörpers bei 16 bis 17% und der Rübenenertrag zwischen 500 und 600 dt/ha. Durch die Nichtzuckerstoffe können etwa 10% des Zuckers nicht auskristallisiert werden, so daß sich ein bereinigter Zuckerertrag von 70 bis 90 dt/ha ergibt. Ein sehr wichtiger Züchtungsbeitrag für den Anbau war auch die Schaffung von Sorten deren Saatgut einzelfruchtig (monokarp, synonym monogerm) ist.

Zunehmende Bedeutung als Zuchtziele erlangen Resistenzen gegenüber Virus- und Pilzkrankheiten sowie gegen Schädlinge. Für die Zuckerrübe sind hier besonders das Rizomania-Virus, die Blattfleckenkrankheit *Cercospora beticola* und der Rübenzystennematode *Heterodera schachtii* zu nennen. In der Spezies *Beta procumbens* finden sich Genotypen, die resistent sind gegenüber diesem Rübenzystennematoden. Das Resistenzgen Hs1^{pro-1} wurde auf einer Translokation von Chromosom I an Chromosom IV in *Beta vulgaris* L. transferiert. Aus Genotypen mit einer solchen Translokation wurde das Resistenzgen von CAI et al. (1997) durch positionelle Klonierung identifiziert.

Die Zuckerrübe ist ein zweijähriger, selbstinkompatibler Fremdbefruchter. Es gibt allerdings dominante Gene für Selbstfertilität und Einjährigkeit.

Kreuzungskompatibilität ist mit den Wildformen der Sektion *Beta* (SMITH 1980) gegeben. Dabei spielt die Spezies *Beta maritima* als Kreuzungspartner für die Züchtung eine besondere Rolle (MCFARLANE 1971). In der Gattung *Beta* treten neben diploiden auch tetraploide und hexaploide Formen mit der Chromosomengrundzahl $x = 9$ auf. Die Chromosomen sind klein, morphologisch sehr ähnlich und deshalb cytologisch nur sehr schwer voneinander zu unterscheiden (ROMAGOSA et al. 1987).

Das haploide Genom der Zuckerrübe ist nach einer Untersuchung von ARUMUGANATHAN und EARLE (1991) etwa 758 Mbp groß. Damit ist es fünfmal größer als das der Acker-Schmalwand (*Arabidopsis thaliana*) (145 Mbp) und eineinhalb mal größer als das Genom von Reis (463 Mbp). Im Vergleich zu anderen Kulturpflanzen ist es relativ klein. Größer sind die Genome von zum Beispiel Weizen (15966 Mbp), Gerste (4873 Mbp), Mais (2716 Mbp), Raps (1235 Mbp), Sojabohne (1115 Mbp) und Tomate (1000 Mbp). Der Anteil an repetitiver DNA im Zuckerrübengenom beträgt etwa 60% (FLAVELL et al. 1974).

Verschieden repetitive Elemente im Rübengenom sind bereits isoliert worden (SCHMIDT et al. 1991, SCHMIDT und HESLOP-HARRISON 1996b). Bei den hier charakterisierten DNA-Elementen handelt es sich um Sequenzen von ca. 100 bis 300 bp. Mit Hilfe der "Southern blot" Hybridisierung wurde deren genomische Organisation untersucht. SCHMIDT und HESLOP-HARRISON (1996b) nutzten zusätzlich die *in situ*-Hybridisierung. Dabei fanden SCHMIDT et al. (1991) heraus, daß die Satelliten-DNAs "BamHI" und "EcoRI" in typischer Form tandemartig im Genom angeordnet sind. Es zeigte sich, daß "BamHI" spezifisch ist für die Sektion *Beta* und daß "EcoRI" auch in den Sektionen *Corollinae* und *Nanae* vorhanden ist. SCHMIDT und HESLOP-HARRISON (1996b) untersuchten Satelliten-DNAs aus *Beta procumbens* an verschiedenen

Spezies der Familie *Chenopodiaceae* allerdings an keiner der Sektion *Beta*. Sie konnten zeigen, daß der *Sau3A* Satellit I im Bereich der Zentromere lokalisiert ist. Dagegen ergaben sich für die *Sau3A* Satelliten II und III relativ gleichmäßige Verteilungen über die Chromosomenbereiche.

Molekulare Marker werden schon seit einigen Jahren in der Genomanalyse und der Züchtung der Zuckerrübe eingesetzt. Über eine indirekte Selektion kann mit Hilfe dieser Marker der Züchtungsprozeß unterstützt werden. Die ersten dafür eingesetzten molekularen Marker waren die RFLP (restriction fragment length polymorphisms)-Marker. Umfangreiche Kopplungskarten für Zuckerrübe wurden von BARZEN et al. (1992, 1995), HALLDÉN, HJERDIN et al. (1996) und PILLEN et al. (1992, 1993) erstellt.

Später kamen als PCR-gestützte Marker die RAPD (random amplified polymorphic DNA)-Marker und die AFLP (amplified fragment length polymorphism)-Marker hinzu. Auch diese wurden bei der Zuckerrübe etabliert und in Kopplungskarten integriert (UPHOFF und WRICKE, 1992, SCHONDELMAIER et al. 1996). Aus allen diesen Karten konnten wichtige Kopplungsinformationen gewonnen werden, so daß entsprechende Marker in der Züchtung eingesetzt werden. Besonders eng gekoppelte Marker wurden dabei in spezifische auf PCR-basierende Marker umgewandelt, um sie routinemäßig in großen Pflanzenzahlen einsetzen zu können.

Auch Mikrosatellitenmarker wurden bereits für die Zuckerrübe entwickelt. MÖRCHEN et al. (1996) entwickelten vier Mikrosatellitenmarker. Die Marker wurden aus einer gröbenselektierten genomischen Plasmidbank isoliert. Durch Hybridisierung wurde nach den Sequenzmotiven $(GT)_n$, $(AT)_n$, $(GA)_n$, $(ATT)_n$ und $(GTG)_n$ gesucht. Einer der Marker enthielt das $(ATT)_n$ -Motiv und drei das $(GA)_n$ -Motiv. In 64 verschiedenen wilden und kultivierten Genotypen zeigten sich für die vier Marker ein, neun und zweimal 13 verschieden Allele.

GROBEN (1998) entwickelte sieben Mikrosatellitenmarker aus genomischen Plasmidbanken, und drei Marker wurden von Sequenzen aus Computerdatenbanken abgeleitet. Es konnten drei Marker in zwei genetische Kopplungskarten integriert werden. Hier wurde auch der Polymorphiegrad der entwickelten Marker und ihre Übertragbarkeit auf andere Gattungen und Spezies untersucht. Von den untersuchten Markern waren 64% polymorph. Diese polymorphen Marker zeigten zwischen zwei und 13 verschiedene Allele. Es ergab sich eine gute Übertragbarkeit innerhalb der Gattung *Beta*. In anderen Gattungen der Familie *Chenopodiaceae* konnten die Mikrosatellitenmarker nur schlecht eingesetzt werden. Auch der Versuch der Übertragbarkeit bzw. der Detektion von Polymorphismen in weiter entfernten Spezies (Möhre,

Gerste, Weizen und Roggen) erwies sich als nicht erfolgreich.

Insgesamt ist die Anzahl der in vorstehenden Arbeiten entwickelten Marker zu gering, um allgemeingültige Aussagen über die Nutzbarkeit von Mikrosatellitenmarkern bei der Zuckerrübe machen zu können.

In Bezug auf Genomanalyse und -evolution untersuchten SCHMIDT und HESLOP-HARRISON (1996a) die Verteilung verschiedener Mikrosatellitenmotive im Genom der Zuckerrübe. Sie nutzten hierfür die *in situ* Hybridisierung. Sie fanden für die einzelnen Motive charakteristische Verteilungsmuster. Dabei zeigte zum Beispiel das (GA)_n-Motiv eine gleichmäßiges Hybridisierungsmuster über alle Chromosomen und Chromosomenbereiche. Dagegen ergaben sich bei dem (GT)_n-Motiv sehr starke Signale in den Zentromerbereichen. Das (TA)_n-Motiv zeigte eine uneinheitliche Verteilung auf den einzelnen Chromosomen.

1.3 Frage- und Aufgabenstellungen dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war es festzustellen, ob Mikrosatelliten als molekulare Marker bei der Zuckerrübe in größerem Umfang genutzt werden können.

Deshalb war die Isolierung und Entwicklung einer möglichst großen Anzahl an Mikrosatellitenmarkern notwendig. Dabei wurde hauptsächlich nach den Di-Motiven (GA)_n und (GT)_n aber auch nach einigen ausgesuchten Tri-Motiven gesucht. Mittels der dabei gefundenen Sequenzen sollten die folgende Fragen beantwortet werden:

- Mit welcher Häufigkeit kommen die obigen Mikrosatellitenmotive im Genom von *Beta vulgaris* vor?
- Gibt es Unterschiede in der Struktur und Größe der Mikrosatelliten zwischen den Motiven?

Aus diesen Mikrosatellitensequenzen sollten dann gut funktionierende Marker entwickelt werden. Damit sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- Wie hoch ist der Polymorphiegrad von Mikrosatellitenmarkern bei der Zuckerrübe im Vergleich zu anderen Kulturpflanzen?
- Unterscheiden sich die Mikrosatellitenmarker im Polymorphiegrad von anderen Markertypen?

Abschließend sollten möglichst viele der entwickelten Marker in eine genetische Kopplungskarte integriert werden. Dies sollte Aufschluß geben über folgende Punkte:

- Sind die Mikrosatellitenmarker gleichmäßig über das Genom verteilt?
- Gibt es Unterschiede in der Verteilung zwischen den Motiven und Motivarten?

2 Material und Methoden

2.1 Entwicklung der Mikrosatellitenmarker

2.1.1 Überblick

Abbildung 2.1 gibt einen Überblick über die hier verwendete Methode zur Isolierung von Mikrosatelliten.

Im ersten Schritt wird genomische DNA von einem homozygoten Genotypen isoliert. Diese wird mit einem häufig schneidendem Restriktionsenzym geschnitten. Die resultierenden DNA-Fragmente werden daraufhin in einen Phagenvektor (hier Lambda ZAPTM Express, Stratagene) ligiert. Anschließend werden die Ligationsprodukte mit einem Verpackungskit verpackt, d.h. sie bekommen die für einen kompletten Phagen notwendige Hülle.

Diese Phagenbank wird dann zusammen mit einem *Escherichia coli*-Stamm auf Medium ausplattiert und über Nacht inkubiert. Daraufhin sind auf der Platte die sogenannten Plaques zu sehen. Dabei handelt es sich um lysierte Bakterien. Jeder Plaque entsteht durch einen Phagenklon. Von diesen Plaques wird ein Abdruck in Form einer Hybridisieremembran gemacht. Dieser wird mit Mikrosatellitenmotiven als radioaktive Sonden hybridisiert. Mit dem daraus resultierenden Radiogramm können dann Klone identifiziert werden, die eine Sequenz mit einem Mikrosatelliten enthalten. Die Plaques dieser Klone werden aus dem Medium herausgepickt und so isoliert. Durch die In Vivo Excision werden die positiven Phagenklone in ein Plasmid umgeformt und als Bakterienklone weitergeführt. Diese Bakterienklone werden nochmals radioaktiv hybridisiert, um die positiven Klone zu bestätigen. Dabei werden diese auf den Hybridisieremembranen ausgestrichen. Die weiterhin positiven Klone werden dann über Nacht in Flüssigmedium vermehrt. Aus dieser Kultur wird die Plasmid-DNA zur Sequenzierung isoliert.

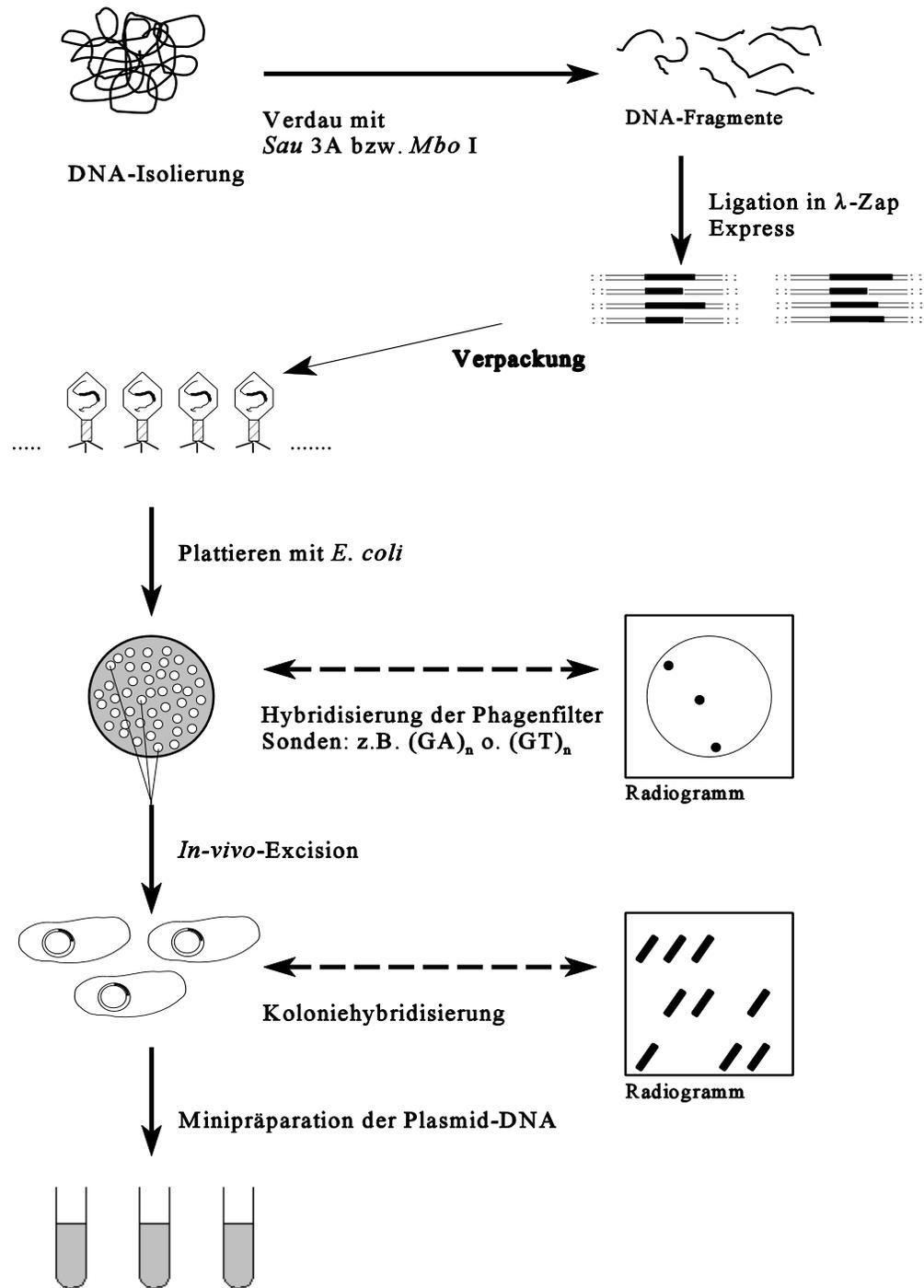


Abb. 2.1: Übersicht über die Isolierung von Mikrosatellitensequenzen aus einer genomischen Phagenbank

2.1.2 Erstellung einer genomischen Phagenbank

DNA von *Beta vulgaris* L. wurde verändert nach einer Minipräparationsmethode von BERNATZKY und TANKSLEY (1986) aus Blattmaterial einer diploiden Inzuchtlinie (ZR9-L01) isoliert. Hierzu wurde frisch geerntetes junges Blattmaterial (ca. 3 g) in flüssigem Stickstoff zu feinem Puder gemörsert. Das Puder wurde in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und sofort mit 25 ml eiskaltem Extraktionspuffer versetzt. Anschließend wurde das Gemisch mit einem Dispergierer für 5-10 Sekunden homogenisiert und für 20 Minuten bei 3000 x g zentrifugiert. Der flüssige Überstand wurde verworfen und das Sediment in 1,25 ml frischem Extraktionspuffer durch kurzes Vortexen wieder gelöst. 1,75 ml Lysis-Puffer und 0,6 ml 5%iges Sarkosyl wurden anschließend zugegeben. Nach mehrmaligem leichten Schwenken erfolgte eine 20-30minütige Inkubation im 60°C Wasserbad. Nach der Zugabe von 7,5 ml Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) wurden die Röhrchen für ca. 2-3 Minuten von Hand geschüttelt. Es erfolgte eine weitere Zentrifugation bei 3000 x g für 20 Minuten. Die danach entstandene obere Flüssigphase wurde in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Durch Zugabe von 4 ml kaltem Isopropanol und Mischen wurde die DNA gefällt. Nach der anschließenden Zentrifugation von fünf Minuten bei 13000 x g wurde der Überstand verworfen und das DNA-Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen. Abschließend trocknete das Pellet an der Luft und wurde dann in H₂O resuspendiert.

Extraktionspuffer:

0,35 M Sorbitol
0,1 M Tris
0,005 M EDTA
pH 8,25 mit HCl einstellen
vor Gebrauch 3,8 g/l Na₂S₂O₅

Lysispuffer:

0,2 M Tris HCl pH 8,0
0,05 M EDTA
2 M NaCl
2% v/w CTAB

Nach der Konzentrationsbestimmung der DNA auf einem Agarosegel im Vergleich zu λ DNA/*Hind* III-Fragmenten (MBI Fermentas) wurden jeweils 30 μ g mit den Restriktionsenzymen *Sau*3A bzw. *Mbo*I über Nacht bei 37°C verdaut.

Restriktionsverdau:

| | |
|------------------|---|
| | DNA |
| 5 U/ μ g DNA | Enzym (<i>Sau3A</i> bzw. <i>MboI</i>) |
| 1 x | Puffer |
| 2,6 mM | Spermidin |
| 0,3 mM | DTT |

Der Ansatz wurde mit 1/10 Volumen 3/1 Na-Acetat und zwei Volumen Ethanol gefällt und in H₂O resuspendiert.

Die erhaltenen Restriktionsprodukte von *Sau3A* wurden auf einem 1%igem Agarosegel zur Größenselektion aufgetrennt. Anhand der als Größenstandard in den Randspuren mit aufgetrennten kb-Leiter (Gibco BRL) wurde ein Agarosestreifen, der die Restriktionsfragmente in einer Größe von 500-1000 bp enthielt, ausgeschnitten. Danach wurden die Fragmente mit dem GenClean[®] II-Kit (Dianova) nach Herstellerprotokoll aus der Agarose eluiert. Für die spätere Sequenzierung der positiven Klone ist eine Insertgröße von 500-1000 bp optimal. In diesem Größenbereich kann die Sequenz des Inserts durch maximal zwei Sequenzierungen vollständig ermittelt werden.

Anschließend wurden der Gesamtverdau von *MboI* und die selektierten Fragmente von *Sau3A* in die *Bam*HI-Klonierungsstelle des Phagenvektors Lambda ZAP[™] Express (Stratagene) ligiert.

Ligation:

| | |
|-----------|-----------------------|
| 1 μ g | λ Zap Express |
| 100 ng | Fragmente |
| 2,5 U | T4-Ligase |
| 1 x | Ligase-Puffer |

Die Ligation erfolgte über 16 Stunden bei 14°C. Es wurden zwei Ligationen mit den Fragmenten des *Sau3A*-Verdau und eine Ligation mit dem Verdau von *MboI* durchgeführt. Die Ligationen wurden bei -20°C gelagert und vor Gebrauch mit dem Gigapack[®] II (Stratagene) nach Herstellerprotokoll verpackt.

2.1.3 Sichtung der Bank auf Mikrosatelliten

Zur Plattierung der Banken wurde der *Escherichia coli* Stamm K802 über Nacht in 2YT angezogen. Die Bakterien wurden sedimentiert und in 10 mM MgSO₄ resuspendiert. K802 und die verpackten Phagen wurden in einem Verhältnis von ca. 6:1 für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Menge an Phagenbank wurde so gewählt, daß sich am Ende möglichst viele, gerade noch einzeln zu erkennende Plaques auf den Platten befanden. Anschließend wurde das Inkubat mit 50°C warmer NZCYM-Topagarose vermischt und auf NZCYM-Agar ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend bei 4°C gelagert.

| 2YT: | | NZCYM: | |
|-------------|----------------------------------|---------------|---|
| 16% | Bacto [®] -Trypton | 10% | Bacto [®] Casein enzy. hydrol. |
| 10% | Bacto [®] Yeast extract | 10% | Bacto [®] Yeast extract |
| 5% | NaCl | 5% | NaCl |
| pH 7,0 | mit NaOH eingestellt | 8 mM | MgSO ₄ x 7H ₂ O |
| 50 mg/l | Kanamycin für 2YTkan | 1% | Bacto [®] Casmino acids |
| | | pH 7,0 | mit NaOH eingestellt |
| | | 1,5% | Agar für Platten |
| | | 0,7% | Agarose für Top-Agarose |

Mittels einer PCR von 50 zufällig gepickten Plaques je Bank konnte die durchschnittliche Größe der Insertionen der Banken bestimmt werden. Die PCR wurde mit M13-Standardprimern bei 50°C Anlagerungstemperatur durchgeführt. Die genauen Reaktionsbedingungen sind im Abschnitt 2.2.3 dargestellt.

Von den vollständig ausgekühlten Platten wurden daraufhin Hybridisierungsfilter (Hybond N⁺, Amersham) abgezogen. Hierzu wurden diese Nylonmembranfilter für ca. zehn Minuten auf die Platten gelegt und die Orientierung durch drei unsymmetrisch gestochene Löcher markiert. Die Denaturierung erfolgte auf 0,5 N NaOH für zehn Minuten. Anschließend wurde jeweils zehn Minuten mit 1 M Tris HCl (pH 8,0) und 2 x SSC inkubiert. Die Filter wurden dabei mit der Plaquesseite nach oben auf einen Flüssigkeitsfilm gelegt und zwischen jedem Arbeitsschritt und am Ende auf Blottingpapier getrocknet.

Zur Hybridisierung wurden die Oligonukleotide (GA)_n und (GT)_n und (TGA)₁₀, (CCG)₁₀ und (AGA)₁₀ als Sonden gemeinsam eingesetzt. Die radioaktive Markierung der Sonden erfolgte durch "random hexamer labelling" (FEINBERG und VOGELSTEIN, 1983) im Heizblock bei 37°C für ca. zwei Stunden.

Radioaktive Markierung: (25 μ l)

| | |
|-------------|-------------------------------------|
| 200 ng | Sonde |
| 30 μ CI | α^{32} P-dCTP |
| 3 U | DNA-Polymerase (Klenow-Fragment) |
| 11 μ l | LS-Mix |

LS-Mix:

| | |
|-------------|------------------------------------|
| 100 μ l | 1 M HEPES (pH 6,6) |
| 100 μ l | DTM |
| 28 μ l | pd(N) ₆ (90 U/ μ l) |

DTM:

| | |
|-------------|------|
| 100 μ M | dATP |
| 100 μ M | dGTP |
| 100 μ M | dTTP |

TM:

| | |
|--------|--------------------------|
| 250 mM | Tris (pH 8,0) |
| 25 mM | MgCl ₂ |
| 50 mM | β -Mercaptoethanol |

in TM lösen

Danach wurden nicht eingebaute Nukleotide durch eine Sephadexsäule von der markierten Sonde abgetrennt. Die Sonde wurde mit 0,4 N NaOH für fünf Minuten denaturiert.

Die Membranen wurden zur Absättigung von unspezifischen Bindungsstellen in Hybridisierungspuffer mit Magermilchpulver (1 g / 100 ml) in Plastikschalen für mindestens vier Stunden vorhybridisiert. Nach der Zugabe der radioaktiven Sonde wurden die Filter für 15-20 Stunden inkubiert. Nicht oder unspezifisch gebundene Sonden wurden anschließend in drei Waschschritten von je 15 Minuten entfernt (Waschpuffer I: 2 x SSC/0,1% SDS; Waschpuffer II: 1 x SSC/0,1% SDS; Waschpuffer III: 0,5 x SSC/0,1% SDS). Vorhybridisierung, radioaktive Hybridisierung und Waschen erfolgte für die Dinukleotid-Motive bei 65°C und die Trinukleotid-Motive bei 55°C. Die Filter wurden auf Röntgenfilmen bei -80°C für ca. 60 Stunden exponiert. Die Signalstärke wurde durch eine Verstärkerfolie intensiviert. Um die Filter für das Screening auf beide Motivtypgruppen einzusetzen, wurden die Sonden entfernt, indem sie nach der ersten Hybridisierung und Auswertung mit kochendem 0,5% SDS gewaschen wurden.

Hybridisierungspuffer:

| | |
|-------|----------------------------|
| 0,5 M | NaPO ₄ (pH 7,2) |
| 7% | SDS |
| 1% | BSA |

NaPO₄ (pH 7,2):

1 M Na₂HPO₄ mit 1 M NaH₂PO₄ auf pH 7,2 einstellen

2 x SSC:

| | |
|-------|---------------|
| 0,3 M | NaCl |
| 0,5 M | Natriumcitrat |

Nach der Entwicklung der Filme wurden die Markierungen zur Ausrichtung der Filter auf die Filme übertragen. Auf einem Leuchtschirm konnten dann die Platten genau auf dem Radiogramm ausgerichtet werden. Die positiven Plaques wurden mit einer Pipettenspitze aus der Platte herausgestochen und in 300 μ l SM überführt.

Eine wiederholte Plattierung und Hybridisierung diente zur Vereinzelung und Bestätigung der positiven Signale. Dabei wurde beim Plattieren eine so geringe Phagenkonzentration gewählt, daß alle Plaques einzeln erfaßt werden konnten.

SM:

| | |
|---------|---------------------------------------|
| 0,1 M | NaCl |
| 0,008 M | MgSO ₄ x 7H ₂ O |
| 0,05 M | Tris HCl pH 8,0 |
| 2% | Gelatine |

Die weiterhin positiven Phagenklone wurden wieder in SM gepickt und mittels der *in-vivo*-Excision in ein Plasmid umgeformt. Dafür wurde der *Escherichia coli* Stamm XL 1-Blue MRF über Nacht in 2YT angezogen und am Morgen eine frische Kultur (Tagkultur) aus der Übernachtskultur angeimpft. Für jeden positiven Phagenklon wurde folgender Ansatz für 20 Minuten bei 37°C inkubiert:

| | |
|-------------|-----------------------------------|
| 2 μ l | ExAssist Helferphage (Stratagene) |
| 100 μ l | Übernachtskultur XL 1-Blue |
| 100 μ l | Phage in SM |

Anschließend wurde der Ansatz in 2 ml 2YT gegeben und für drei Stunden bei 37°C inkubiert. Das anschließende Abtöten und Aufbrechen der Bakterien erfolgte im 70°C Wasserbad für 20 Minuten. Die Bakterien wurden durch eine Zentrifugation von fünf Minuten bei 200 x g sedimentiert. 400 μ l Überstand wurden mit 400 μ l XL 1-Blue Tagkultur versetzt und wiederum für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Abschließend wurde die Kultur durch Zentrifugieren aufkonzentriert und in 100 μ l auf LB-Agar mit Kanamycin (LBkan) plattiert.

LB:

| | |
|---------|----------------------------------|
| 10% | Bacto [®] -Trypton |
| 5% | Bacto [®] Yeast extract |
| 10% | NaCl |
| pH 7,0 | mit NaOH eingestellt |
| 1,5% | Agar für Platten |
| 50 mg/l | Kanamycin für LBkan |

Nach 20 Stunden Wachstum bei 37°C wurden zur Koloniehybridisierung von jedem Ausgangsklon sieben Kolonien gepickt und auf ein Raster auf einer LBkan-Platte und einer Nylonmembran übertragen. Die Membranen wurden ebenfalls auf LBkan-Agar aufgelegt und zusammen mit der Rasterplatte über Nacht bei 37°C inkubiert. Fixierung, radioaktive Hybridisierung und das Exponieren dieser Koloniefilter erfolgte wie bei den Phagenfiltern.

2.1.4 Sequenzierung der positiven Klone

Zur Isolierung der Plasmide wurden die positiven Klone der Koloniehybridisierung von der Rasterplatte gepickt und in fünf ml 2YTkan über Nacht angezogen. Am nächsten Morgen wurde von jedem Klon eine Glycerinkultur (500 µl 50%iges Glycerin + 500 µl Kultur) bei -80°C eingelagert. Aus den verbleibenden 4,5 ml erfolgte die DNA Isolierung und Aufreinigung mit dem QIAwell 8 Plus Kit (Quiagen) nach dem Herstellerprotokoll. Das Eluat wurde mit 0,7 Volumen Isopropanol gefällt und 30 Minuten bei 15000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und in 25 µl H₂O resuspendiert.

Die Sequenzierung erfolgte nach SANGER et al. (1977) und CHEN und SEEBURG (1985) sowohl mit dem A.L.F.-DNA Sequenziergerät (Pharmacia) als auch mit dem ABI-377-DNA-Sequenziergerät (PE Biosystems). Am A.L.F.-DNA Sequenziergerät wurden die Sequenzierungen von Susanne König (IPK Gatersleben) mit dem Cy5™ AutoRead™ Sequencing Kit und am ABI-377 von Sonja Gentz (IPK Gatersleben) mit dem PRISM™ Ready Reaction dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Kit durchgeführt. Die für die Sequenzierung verwendeten Primer sind in Tabelle 2.1 aufgeführt. Sie wurden so ausgewählt, daß die lesbaren Sequenzen an der Klonierungsstelle beginnen.

Tab. 2.1: Sequenzierprimer mit ihren Bezeichnungen und Nukleotidsequenzen
(Leserichtung vom 5'- zum 3'-Ende) für das ABI-377- und das A.L.F.-DNA-
Sequenziergerät

| Primerbezeichnung | Primersequenz |
|-------------------|--------------------------------|
| ABI-377 | |
| pBKM3 | AAT TGG GTA CAC TTA CCT GGT AC |
| pBKP5 | CCA AGC TCG AAA TTA ACC CTC |
| A.L.F. | |
| MVL | GCC GCT CTA GAA GTA CTC TC |
| MVR | CTA AAG GGA ACA AAA GCT GG |

Alle Klone wurden zuerst nur von einer Seite sequenziert und die negativen Klone dann im zweiten Schritt von der anderen Seite. War bei positiven Mikrosatellitensequenzen eine größere Leseweite notwendig, wurde möglichst nahe an dem Mikrosatelliten ein Primer gesetzt und mit diesem erneut sequenziert. Dieser Primer diente später auch als PCR-Primer.

2.1.5 Selektion, Homologievergleiche und Ableiten der Primersequenzen

Auf Grund der Möglichkeit von chimären Insertionen wurden die Mikrosatelliten enthaltenden Sequenzen nach Schnittstellensequenzen (GATC) durchsucht und eventuell nur das Sequenzfragment mit dem Mikrosatelliten herausgeschnitten. Mikrosatelliten, die zu nah an einer Schnittstelle lagen, und damit nicht genügend flankierende Sequenzen aufwiesen, wurden ausselektiert. War eine vollständige Erfassung von Mikrosatelliten mit ihren flankierenden Sequenzen auch durch erneute Sequenzierung nicht möglich, so wurden diese nicht weiter verfolgt. Auch Motive mit weniger als zehn Wiederholungseinheiten wurden in der Regel nicht verwendet.

Die Sequenzen wurden untereinander und zu der Satelliten- DNA "BamHI" (SCHMIDT et al. 1991) auf Homologien untersucht. Dazu wurden nur die flankierenden Sequenzen verwendet. Für die Homologievergleiche wurde die "Contig Manager"-Funktion des Programms MacDNASIS Pro v 2.4 (Hitachi Software Engineering Co. 1994) genutzt. Sequenzen mit

Homologien von mehr als 90% zu einer anderen Mikrosatellitensequenz oder zu "BamHI" wurden verworfen.

Für die verbleibenden Mikrosatellitensequenzen wurden flankierende PCR-Primer abgeleitet. Dies wurde mit dem Programm PRIMER Version 0.5 (Whitehead Institute for Biomedical Research, 1991) durchgeführt. Dabei wurde darauf geachtet, daß die Primer zwischen 18 und 22 bp lang sind und daß jeder Primer eines Paares eine annähernd gleich hohe Schmelztemperatur (T_M -Werte) hat. Außerdem wurde auf eine geringe Neigung zur Bildung von Dimeren und anderen Sekundärstrukturen selektiert. Das erwartete Amplifikationsprodukt der Primerpaare sollte möglichst 100 bis 250 bp groß sein.

Die Primer wurden von den Firmen Pharmacia und MWG Biotech synthetisiert. Zur späteren Detektion der Amplifikate am A.L.F.-DNA Sequenziergerät wurde ein Primer am 5'-Ende mit Fluorescein markiert.

2.1.6 Benennung der Marker

Der erste Teil des Markernamens ist die Abkürzung "GZM" für Gaterslebener Zuckerrüben Mikrosatellit. Marker mit einem Trinukleotid-Motiv enthalten in ihrem Namen als Zusatz den Buchstaben T. Als zweiter Teil folgt eine dreistellige Nummer. Diese ist innerhalb der Di- bzw. Trinukleotid-Motivmarker bei der Auswahl der Primerpaare fortlaufend vergeben worden.

2.2 PCR-Reaktion und Fragmentanalyse

2.2.1 DNA-Isolierung für PCR

Für das im folgenden verwendete Pflanzenmaterial wurde die DNA nach einem veränderten Mikropräparationsprotokoll von BERNATZKY und TANKSLEY (1986) isoliert. Dazu wurde ein Blattplättchen mit dem Deckel eines 1,5 ml Reaktionsgefäßes ausgestochen und in diesem bei -80°C gelagert. Für Mischproben wurden mehrere Blattplättchen mit einem 5 mm Korkbohrer ausgestochen und in das 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

Extaktionspuffer, Lysispuffer und 5%iges Sarkosyl (siehe Abschnitt 2.1.2) wurden im Verhältnis 5:5:2 vermischt. Die Blattprobe wurde in 600µl Puffer mit einem an einem Rührwerk laufenden Edelstahl-Mikropistill zerkleinert. Nach einer Inkubation von 20-30 Minuten bei 60°C wurden die Zellwandbestandteile, Proteine und Polysaccharide mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Die DNA wurde mit Isopropanol gefällt, das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und in 200 µl H₂O resuspendiert. Nach einer visuellen Konzentrationsbestimmung auf einem Agarosegel wurde die DNA normalerweise 1:10 für die PCR verdünnt.

2.2.2 PCR-Reaktionsbedingungen

Die Reaktionsbedingungen gelten sowohl für die Mikrosatellitenmarker-Analyse als auch für die Plaque-PCR aus Abschnitt 2.1.3. Die PCR-Reaktionen wurden mit den Thermocyclern GeneAmp PCR System 9600 (PE Biosystems) und PTC-225 (MJ Research) durchgeführt.

Die Amplifikation erfolgte je nach T_M-Werten der Primerpaare mit 50 bzw. 60°C Anlagerungstemperatur mit folgendem Reaktionsprofil:

| | | | |
|---------------|--------------|-----------|------|
| | 95°C | 3 Minuten | |
| Denaturierung | 95°C | 1 Minute | 35 x |
| Anlagerung | 50 bzw. 60°C | 1 Minute | |
| DNA-Synthese | 72°C | 2 Minuten | |
| | 72°C | 7 Minuten | |
| | 4°C | ∞ | |

Der Standardansatz erfolgte in einem Volumen von 25 μ l und war wie folgt zusammengesetzt:

| | |
|--------------|--|
| ca. 25-50 ng | DNA |
| 500 nM | Primer L |
| 500 nM | Primer R |
| 0,25 mM | jedes Nukleotid (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) |
| 10 mM | Tris HCl (pH 8,0) |
| 1,5 mM | MgCl ₂ |
| 50 mM | KCl |
| 0,01% | Gelatine |
| 0,5 U | <i>Taq</i> - Polymerase |

2.2.3 Fragmentanalyse und -auswertung

Da einer der beiden Primer mit Fluorescein markiert war, konnte eine Auftrennung und Detektion der amplifizierten Fragmente am A.L.F.-DNA Sequenziergerät durchgeführt werden. Es wurden kurze Gelträgerplatten mit einer Trennlänge von 9 cm und einer Geldicke von 0,35 mm genutzt.

Nach der Reinigung der Glasplatten mit H₂O und Isopropanol wurde der Bereich, in dem sich später die Taschen des Gels befinden mit Bindsilane/Essigsäure (4:1) behandelt. Für die Polyacrylamidgele wurde die Fertiglösung Sequagel™ XR (National Diagnostics) benutzt.

Die 6%ige Matrix wurde durch Mischen von 20 ml Monomerlösung mit fünf ml Pufferlösung erhalten und mit einer Wasserstrahlpumpe durch einen Nylonmembranfilter (0,45 μ m) gefiltert und für 1-2 Minuten entgast. Nach dem Zumischen von 200 μ l Ammoniumpersulfat (10%) wurde das Gel sofort gegossen und nach mindestens zwei Stunden Polymerisationszeit benutzt.

Die Auftrennung erfolgte in 1 x TBE Puffer unter folgenden Bedingungen:

| | | |
|-------------------------|-------------|---------------|
| - 600 V | | |
| - 40 mA | TBE: | |
| - 50 W | 0,9 M | Tris |
| - 50°C Geltemperatur | 25 mM | EDTA |
| - 2 mW Laserstärke | 0,9 M | Borsäure |
| - 0,84 sec Meßintervall | | autoklavieren |

Als Ladepuffer wurde 5 mg/ml Dextran blue gelöst in deionisiertem Formamid verwendet. Diesem wurde zusätzlich noch jeweils zwei interne Standards im Verhältnis 1:10 bis 1:20 zugegeben. Durch eine Plasmid-PCR (pBluescript II SK von Stratagene) wurden die Standards selbst hergestellt (Tab. 2.2). Die Plasmid-PCR wurde, wie in Abschnitt 2.2.2 beschrieben, bei 50°C Anlagerungstemperatur durchgeführt. Die Kombination der beiden internen Standards wurde so gewählt, daß sie unter- und oberhalb und nah an den erwarteten Fragmenten lagen. Standardmäßig wurden 1,5 µl (0,5-3,0 µl) PCR-Produkt vermischt mit 2,5 µl Ladepuffer für 90 Sekunden bei 95°C auf dem Heizblock denaturiert, auf Eis gestellt und sofort auf das Gel aufgetragen. Außerdem wurden in der ersten und letzten Spur nur drei externe Standards aufgetragen. Nach einer Laufzeit von ca. 60 Minuten hatten die Fragmente bis zu einer Größe von ca. 250 bp die Detektionslinie des Lasers erreicht. Wurden keine größeren Fragmente erwartet, so konnte der Lauf beendet und es konnten neue Proben geladen werden. Auf diese Weise war es möglich, jedes Gel für bis zu fünf Läufe zu verwenden.

Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Fragment Manager Version 1.2 (Pharmacia). Der in der ersten und letzten Spur zusätzlich aufgetragene Standard, der von der Größe her zwischen den beiden internen Standards lag, wurde als extern definiert. Dieser wurde bei der Berechnung für alle Spuren mit einbezogen. Außerdem lagen in jeder Spur zwei interne Standards vor, so daß die Größe der Fragmente bis auf 1 bp genau bestimmt werden konnte.

Tab. 2.2: Nukleotidsequenzen (Leserichtung vom 5'- zum 3'-Ende) der Primer für das Plasmid pBluescript II SK (Stratagene) und die daraus resultierenden Fragmentgrößen in bp für die Größenstandards der Fragmentanalyse

| Name | Fluorescein-markierter Primer | Unmarkierter Primer | Fragmentgröße |
|------|-------------------------------|----------------------------|---------------|
| 8b | CGA GGT CGA CGG TAT CG | CGC TCT AGA ACT AGT GGA TC | 70 bp |
| 8a | GCC GCT CTA GAA CTA GTG | TCG AGG TCG ACG GTA TC | 73 bp |
| 3 | CGA GGT CGA CGG TAT CG | AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG | 122 bp |
| 2 | CGT TGT AAA ACG ACG GCC AGT | AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG | 196 bp |
| 1b | GAA ACA GCT ATG ACC ATG | GT AAA ACG ACG GCC AGT | 226 bp |
| 1a | CGT TGT AAA ACG ACG GCC AGT | G GAA ACA GCT ATG ACC ATG | 231 bp |

2.3 Untersuchung der Mikrosatellitenmarker auf Funktion und Polymorphiegrad

2.3.1 Funktionstest der Primerpaare

Zum Testen der Primerpaare der Mikrosatellitenmarker wurde DNA von der Linie ZR9-L01 verwendet. Aus der DNA dieses Genotyps wurden die Mikrosatelliten isoliert (Abschnitt 2.1.2). Dazu wurde mit den Primerpaaren je nach ihrem errechneten T_M -Werten eine PCR bei 50°C oder 60°C Anlagerungstemperatur durchgeführt. Wurde bei 60°C keine oder nur eine sehr schwache Amplifikation erhalten, so wurde das entsprechende Primerpaar bei 50°C getestet. Im umgekehrten Fall, bei einer unspezifischen Amplifikation bei 50°C, wurde eine PCR bei 60°C durchgeführt. Alle Marker, die bei 50°C immer noch kein Amplifikat ergaben oder bei 60°C unspezifisch reagierten, wurden verworfen.

2.3.2 Bestimmung des Polymorphiegrades der Mikrosatellitenmarker

2.3.2.1 Pflanzenmaterial, RFLP- und AFLP-Markerdaten

Zur Ermittlung des Polymorphiegrades der entwickelten Mikrosatellitenmarker wurden diese an einem Sortiment aus 23 Linien getestet. Die Linien stammen von der KWS Saat AG in Einbeck und repräsentieren das dort in der Züchtung eingesetzte genetische Material (Tab. 2.3). Es handelt sich zum größten Teil um Linien in der zweiten bis vierten Selbstungsgeneration (S_2 - S_4 Linien). Für die DNA-Extraktion wurde bei diesen Linien Blattmaterial von ca. zehn Einzelpflanzen gepoolt. Bei vier dieser Linien wurden eine Einzelpflanze verklont und von den Klonen dann Blattmaterial geerntet. Außerdem befanden sich drei DH-Linien im Sortiment.

Tab. 2.3: Linien zum Test auf den Polymorphiegrad mit ihren Labornummern, der Beschreibung des Linientyps und der Angabe ob multi- (MU) oder monogerm (MO)

| Labornummer | Linientyp | MU/MO | Labornummer | Linientyp | MU/MO |
|-------------|-----------------------|-------|-------------|-----------------------|-------|
| ZR9-L01* | DH-Linie | MU | ZR9-L13 | S ₂ -Linie | MU |
| ZR9-L02 | S ₃ -Linie | MU | ZR9-L14 | S ₂ -Linie | MU |
| ZR9-L03 | S ₂ -Linie | MU | ZR9-L15 | S ₃ -Linie | MU |
| ZR9-L04 | S ₂ -Klon | MO | ZR9-L16 | S ₂ -Linie | MO |
| ZR9-L05 | S ₂ -Klon | MO | ZR9-L17 | S ₂ -Linie | MU |
| ZR9-L06 | S ₂ -Linie | MO | ZR9-L18 | S ₂ -Linie | MU |
| ZR9-L07 | S ₂ -Linie | MU | ZR9-L19 | DH-Linie | MU |
| ZR9-L08 | DH-Linie | MO | ZR9-L20 | S ₂ -Klon | MO |
| ZR9-L09 | S ₂ -Linie | MO | ZR9-L21 | S ₃ -Linie | MU |
| ZR9-L10 | S ₃ -Linie | MO | ZR9-L22 | S ₂ -Klon | MU |
| ZR9-L11 | DH-Linie | MO | ZR9-L23 | S ₃ -Linie | MO |
| ZR9-L12 | S ₃ -Linie | MU | | | |

* Genotyp, aus dessen DNA die Bank für die Mikrosatellitenisolation erstellt wurde.

Für den Vergleich der Mikrosatellitenmarker mit den Markertypen RFLP und AFLP in Bezug auf ihren Polymorphiegrad wurden neun Zuckerrübenlinien mit je fünf Einzelpflanzen (A-E) untersucht (Tab. 2.4). Die Linien befanden sich in der S₂-S₄ Generation. Sieben dieser Linien waren auch in dem Sortiment zur Bestimmung des Polymorphiegrades der Mikrosatellitenmarker enthalten.

Tab. 2.4: Linien zum Vergleich der Markertypen (je fünf Einzelpflanzen: A-E) mit ihren Linienbezeichnungen, der Beschreibung des Linientyps und der Angabe ob multi- (MU) oder monogerm (MO) und den entsprechenden Labornummern aus Tabelle 2.3

| Linienbezeichnung | Linientyp | MU/MO | △ |
|-------------------|---|-------|---------|
| ZR6-1 | S ₂ -Linie | MO | ZR9-L06 |
| ZR6-2 | S ₂ -Linie | MO | - |
| ZR6-3 | S ₂ -Linie | MO | ZR9-L05 |
| ZR6-4 | S ₂ -Linie | MU | ZR9-L14 |
| ZR6-5 | S ₂ -Linie | MU | ZR9-L13 |
| ZR6-6 | S ₂ -Linie | MO | ZR9-L04 |
| ZR6-7 | S ₂ -Linie | MU | ZR9-L17 |
| ZR6-8 | S ₃ -Linie (aus Kloneinzelpflanze) | MU | ZR9-L21 |
| ZR6-9 | S ₂ -Linie (aus Kloneinzelpflanze) | MU | - |

Die RFLP-Daten wurden von der KWS Saat AG zur Verfügung gestellt. Sie basieren auf 42 Sonden mit insgesamt 204 polymorphen Fragmenten. Einige Sonden detektierten mehrere Loci. Die Erfassung der Fragmente erfolgte dominant, so daß diese nicht als Allele angesprochen werden konnten.

Auch die AFLP-Daten stammten von der KWS Saat AG. Aus sieben Primerkombinationen wurden 188 polymorphe, ebenfalls dominant erfaßte, Fragmente verwendet. Bei den AFLP-Markern fehlte der Datensatz der Pflanze ZR6-4E vollständig.

Bei den Mikrosatellitenmarkern wurden 41 Marker mit insgesamt 148 Allelen analysiert. (siehe Anhang Tab. 7.2)

2.3.2.2 Ermittlung der Anzahl Allele und der PIC-Werte

Mit der DNA der 23 Linien wurde, wie in Abschnitt 2.2.2 beschrieben, eine PCR durchgeführt und die Produkte am A.L.F.-DNA Sequenziergerät detektiert. Unterschiedlich große Fragmente wurden dabei als Allele definiert. Auch 1 bp Differenzen wurden als unterschiedliche Allele erfaßt, wenn sie reproduzierbar auftraten. Keine Amplifikation, wenn sie reproduzierbar nur in

einzelnen Genotypen auftrat, wurde als Nullallel definiert. Unspezifische Fragmente oder zusätzliche Banden, die sich außerhalb des erwarteten Fragmentgrößenbereiches befanden, wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

Für die Marker, für die der gesamte Datensatz des Sets zur Verfügung stand, wurde der "Polymorphism Information Content" (PIC-Wert) (BOTSTEIN et al. 1980) nach einer vereinfachten Formel von ANDERSON et al. (1993) berechnet:

$$\text{PIC}_j = 1 - \sum_{i=1}^n p_{ij}^2.$$

Darin ist:

PIC_j der PIC-Wert des Markers j in der analysierten Linienstichprobe,

p_{ij} die Frequenz des Allels i des Marker j in der analysierten Linienstichprobe,

n die Anzahl Allele des Markers j in der analysierten Linienstichprobe.

Der PIC-Wert nach ANDERSON et al. (1993) hat die gleiche Aussage wie die Gen-Diversität nach WEIR (1990) und die erwartete Heterozygotie nach NEI (1973).

Bei dieser Berechnung wird von maximal zwei Allelen je Genotyp ausgegangen. Es wird also ein diploider Organismus vorausgesetzt. Bei den hier untersuchten Zuckerrübenlinien handelt es sich um diploide Formen. Allerdings ist die zu untersuchende DNA der S_2 - S_4 -Linien jeweils ein Gemisch aus zehn Einzelpflanzen einer Linie. Da diese Linien in größerem Umfang in der Züchtung eingesetzt werden, sind sie mehrfach vermehrt worden. Dabei kann es zu Fremdeinstäubungen gekommen sein. Dadurch traten bei einigen Linien drei Allele auf. Zur Berechnung der PIC-Werte wurden hier anhand der Fragmentintensitäten die beiden Hauptallele ausgewählt und verrechnet.

2.3.3.3 Klusteranalyse

Auch für die Klusteranalyse der 23 Genotypen wurden je Linie maximal zwei Hauptallele anhand ihrer Fragmentintensität ausgewählt. Die Daten des Liniensortiments von ausgewählten Markern wurden in eine 1/0-Datenmatrix überführt. Dabei erhält eine Linie eine "1", wenn sie das betreffende Allel trägt oder eine "0" wenn sie das Allel nicht trägt. Der Datensatz wurde dann mit dem Computerprogramm NTSYS-pc Version 1.80 (ROHLF 1993) verrechnet.

Die genetischen Distanzen wurde nach dem Koeffizienten von JACCARD (1908) zitiert in SOKAL und SNEATH (1963) ermittelt:

$$GD_{ij} = a_{ij} / (n - d_{ij})$$

Darin ist:

GD_{ij} die genetische Distanz zwischen den Linien i und j,

a_{ij} die Anzahl gemeinsamer Allele der Linien i und j,

n die gesamte Anzahl an Allelen in der analysierten Linienstichprobe,

d_{ij} die Anzahl gemeinsamer Nullen der Linien i und j.

Die weiteren Berechnungen und Darstellungen erfolgten mit den genetischen Ähnlichkeiten (GS_{ij}), die sich direkt aus den genetischen Distanzen ergeben:

$$GS_{ij} = 1 - GD_{ij}$$

Als Klustermethode wurde die "Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Average" (UPGMA) ausgewählt.

Aus den ungewichteten Mittelwerten wurden dann die kophänetischen Gleichheiten ermittelt. Diese kophänetische Matrix konnte mit der Matrix der genetischen Ähnlichkeiten verglichen werden. Die daraus resultierende kophänetische Korrelation ist ein Maß für die Übereinstimmung zwischen der Clusteranalyse und den paarweisen genetischen Ähnlichkeiten. Da hier die eine Matrix aus den Werten der anderen indirekt ermittelt wurde, ist die Berechnung der Signifikanz nicht sinnvoll. Solche Korrelationen zeigen meist eine statistische Signifikanz (ROHLF and FISHER 1968).

Für den Markervergleich zwischen Mikrosatelliten-, RFLP- und AFLP-Markern wurde die Clusteranalyse wie oben beschrieben durchgeführt. Es handelt sich hierbei um Einzelpflanzen, so daß bei der Fragmentanalyse nicht mehr als zwei Allele auftraten. Da hier die Markerdaten nur dominant erfaßt wurden, muß allerdings beim Jaccard Koeffizienten a_{ij} mit der Anzahl von Fragmenten, und nicht mit der Anzahl von Allelen, definiert werden.

Für die resultierenden Matrizen und die Dendrogramme wurde ebenfalls die kophänetische Korrelation berechnet. Außerdem wurden die Korrelationen zwischen den Matrizen der genetischen Ähnlichkeiten der verschiedenen Markertypen berechnet. Die Signifikanzen der Korrelationen wurden nach dem Mantel-Matrix-Korrespondenz-Test (MANTEL 1967) getestet.

2.4 Kartierung der Mikrosatellitenmarker

2.4.1 Die Kartierungspopulationen

Zur genetischen Kartierung der Mikrosatellitenmarker wurden von der KWS Saat AG zwei F₂-Populationen (9502- und 9704-Population) zur Verfügung gestellt.

Begonnen wurde mit der 9502-Population, deren Eltern ZR9-L04 und ZR9-L08 sich in der Resistenz gegen den Pilz *Cercospora beticola* und in Ertragsmerkmalen unterscheiden. Die Eltern dieser Population waren in dem Test auf Polymorphismus (siehe 2.3.2.1, Tab. 2.3) mit einbezogen. Anhand der dort gewonnenen Daten konnten direkt die zwischen den Eltern polymorphen Mikrosatellitenmarker ausgewählt werden.

Eine Subpopulation von 81 Pflanzen aus der Gesamtpopulation (211 Pflanzen) wurde für die Kartierung der Mikrosatellitenmarker ausgewählt. Hier standen als bereits kartierte Marker 79 RFLP-, vier STS- und ein Mikrosatellitenmarker zur Verfügung.

Im nächsten Schritt wurden in der 9704-Population alle polymorphen Marker kartiert, die in der 9502-Population nicht polymorph waren. Auch die beiden Eltern dieser Population, die Linien ZR9-L02 und ZR9-L22, wurden in dem Test auf Polymorphismus eingesetzt.

In der 9704-Population standen Kartierungsdaten von 26 RFLP-Markern zur Verfügung. Diese waren gut über alle neun Chromosomen verteilt. Aus 185 Einzelpflanzen wurde eine Subpopulation von 121 Pflanzen zur Kartierung ausgewählt.

2.4.2 Kartierung mit MAPMAKER

Von SCHONDELMAIER und JUNG (1997) wurden die neun Kopplungsgruppen den neun Chromosomen nach BUTTERFAß (1964) zugeordnet. Diese Zuordnung wurde in der vorliegenden Arbeit berücksichtigt und die Kopplungsgruppen nach den entsprechenden Chromosomen benannt.

Für die Kartierung wurden die Markerdaten aller Einzelpflanzen der Gesamtpopulationen verrechnet. Bei den Mikrosatellitendaten entstanden somit durch die nicht getesteten Pflanzen eine entsprechende Anzahl von Fehlstellen. Die Kopplungsanalyse erfolgte mit dem Programm MAPMAKER Version 2.0 (LANDER et al. 1987). Die Schätzung der Rekombinationswerte

erfolgt bei MAPMAKER mittels der Maximum-Likelihood-Methode. Der kritische LOD-Wert (Logarithmic Odds Ratio) wurde mit 3.0 festgelegt. Wird dieser Wert eingehalten, so ist der geschätzte Rekombinationswert um den Faktor 1000 wahrscheinlicher als bei Annahme einer freien Spaltung. Zur Berechnung der centi-Morgan-Einheiten (cM) aus den Rekombinationswerten wurde die Kosambi Funktion (KOSAMBI 1944) ausgewählt. Da von den RFLP- und STS-Markern die Chromosomenpositionen bekannt waren, wurde mit diesen eine Karte mit neun Kopplungsgruppen gebildet. Dazu wurde aus fünf Markern jedes Chromosoms mit dem Befehl "compare" ein Gerüst erstellt. Zusätzliche bekannte Marker wurden dann mit dem "try"-Befehl in die entsprechenden Kopplungsgruppe integriert. Dabei wird ein neuer Marker in jedes mögliche Intervall gesetzt und eine Dreipunktanalyse durchgeführt und die Platzierung mit der höchsten Wahrscheinlichkeit ermittelt. Mit der "ripple" Funktion wurde die Anordnung aller bekannten Marker überprüft. Dabei werden noch einmal alle möglichen Anordnungen der Marker in Dreipunktanalysen verglichen und die Anordnung mit der höchsten Wahrscheinlichkeit ausgewählt.

Die neuen Mikrosatellitenmarker wurden mit dem "place"-Befehl in die Karten integriert. Dieser Befehl führt Zweipunkt-, Dreipunkt- und Mehrpunktanalysen stufenweise durch. Dabei wird der neue Marker zuerst durch Zweipunktanalysen mit allen Loci einer Kopplungsgruppe zugeordnet. In dieser Kopplungsgruppe werden dann die möglichen Positionen des Markers durch Dreipunktanalyse ermittelt. Die Mehrpunktanalyse ergibt dann die Position mit der höchsten Wahrscheinlichkeit. Abschließend wurden alle Kopplungsgruppen, in die Mikrosatellitenmarker integriert wurden, noch einmal mit der "ripple"-Funktion überprüft.

Ergebnisse

3.1 Eigenschaften der genomischen Phagenbanken

Für die Isolierung der Mikrosatelliten wurde in dieser Arbeit Phagenbanken verwendet. Nach dem Ausplattieren wurde durch Auszählen die Anzahl Plaques je μl bestimmt und je Bank zufällig 50 Plaques gepickt und mit diesen eine PCR mit M13-Primern durchgeführt. Es zeigte sich, daß die Insertionen im Schnitt eine Größe von 900 bp hatten (Tab. 3.1). Die Bank A aus dem *MboI*-Verdau hatte im Mittel mit 600 bp die kleinsten Fragmente, die Bank E die geringste Anzahl Klone (24000). In Bezug auf die Anzahl Klone und die durchschnittliche Insertionsgröße war die Bank C die beste von den hier gesichteten.

Es ergibt sich für alle Banken zusammen ein Umfang von $1,84 \times 10^8$ bp, was etwa 25% des haploiden Zuckerrüben-genoms entspricht.

Tab. 3.1: Die genomischen Phagenbanken mit der Art ihrer Insertionen, der Anzahl Klone, der mittleren (\bar{x}) Insertgröße und der Anzahl gesichteter bp

| Bank | DNA-Fragmente | Anzahl Klone | \bar{x} Insertgröße (bp) | Gesichtete bp |
|----------|-------------------------------|--------------|-------------------------------|---------------------|
| A | <i>MboI</i> Verdau | 35000 | 600 | $21,0 \times 10^6$ |
| C | <i>Sau3A</i> Frag. 500-1000bp | 68000 | 900 | $61,2 \times 10^6$ |
| E | <i>Sau3A</i> Frag. 500-1000bp | 24000 | 850 | $20,4 \times 10^6$ |
| F | <i>Sau3A</i> Frag. 500-1000bp | 35000 | 850 | $29,8 \times 10^6$ |
| G | <i>Sau3A</i> Frag. 500-1000bp | 43000 | 1200 | $51,6 \times 10^6$ |
| Σ | | 205000 | 900 | $184,0 \times 10^6$ |

3.2 Vorkommen von Mikrosatelliten im Genom von *Beta vulgaris*

Die Phagenbanken wurden mit den Dinukleotid-Motiven (GA)_n und (GT)_n als Sonden gesichtet (Tab. 3.2). Insgesamt waren von 205000 Klonen 0,4 % positiv. Als grobe Abschätzung entspricht das bei einer durchschnittlichen Insertgröße von 900 bp einer Häufigkeit von einem (GA)_n oder (GT)_n Mikrosatellit alle 225 kb.

Von den positiven Klonen blieben nach Bestätigung der Signale, *in-vivo*-Excision und Koloniehybridisierung etwa 40 % übrig. Nach der Sequenzierung der Plasmidklone wurde in etwa 55 % der Sequenzen ein Mikrosatellit gefunden. In diesen Sequenzen waren die Motive (GA)_n und (GT)_n etwa zu gleichen Anteilen vertreten.

Mit dem Suchen nach Trinukleotid-Motiven wurde erst später begonnen, so daß die Bank C nicht und die Bank A nur teilweise gesichtet wurde. Nach dem Entfernen der (GA)_n- und (GT)_n-Sonden wurden die Filter mit den Trinukleotid-Motiven hybridisiert. In den Banken A, E und F waren dies (TGA)₁₀ und (CCG)₁₀ und in der Bank G zusätzlich (AGA)₁₀. Hier waren im ersten Screening im Durchschnitt 0,17 % der Phagenklone positiv. Es wurden etwa 118,6 x 10⁶ bp gesichtet. Danach läßt sich auf einen durchschnittlichen Abstand der hier verwendeten Trinukleotid-Mikrosatelliten von 527 kb schließen. Auch hier standen am Ende 40 % der positiven Phagenklone als Plasmidklone zur Sequenzierung zur Verfügung. Die Ausbeute an Mikrosatelliten-tragenden Sequenzen betrug etwa 30 % der ursprünglich identifizierten Plasmidklone.

Es wurde nur in einer Sequenz das (AGA)_n-Motiv als zusammengesetzter Mikrosatellit mit dem (TGA)_n-Motiv gefunden.

Für das (CCG)_n-Motiv wurde keine Sequenz gefunden. Es ergab sich bei vielen Klonen ein früher Abbruch der Sequenzierreaktion. Diese könnte auf das (CCG)_n-Motiv zurückzuführen sein. Durch den hohen GC-Gehalt ergeben sich eventuell Sekundärstrukturen, welche die Sequenzierreaktion stören. Die verbleibenden positiven Sequenzen enthielten somit nur das TGA-Motiv.

Tab. 3.2: Effizienz der Mikrosatellitenisolierung aus verschiedenen genomischen Banken (A-G) und insgesamt, bei den Dinukleotid- und Trinukleotid-Motiven

| | A | C | E | F | G | Σ | % |
|--|-------|-------|-------|-------|-------|----------|--------|
| Dinukleotid-Motive | | | | | | | |
| Gesichtete Klone | 35000 | 68000 | 24000 | 35000 | 43000 | 205000 | 100,00 |
| Positive Phagenklone | 172 | 406 | 56 | 142 | 47 | 823 | 0,40 |
| Positive Plasmidklone | 60 | 187 | 28 | 46 | 18 | 339 | 0,17 |
| Mikrosatelliten enthaltende Sequenzen | 31 | 106 | 16 | 26 | 8 | 187 | 0,09 |
| Trinukleotid-Motive¹ | | | | | | | |
| Gesichtete Klone | 28000 | - | 24000 | 35000 | 43000 | 130000 | 100,00 |
| Positive Phagenklone | 93 | - | 25 | 47 | 60 | 225 | 0,17 |
| Positive Plasmidklone | 43 | - | 12 | 13 | 28 | 96 | 0,07 |
| Mikrosatelliten enthaltende Sequenzen | 17 | - | 5 | 4 | 4 | 30 | 0,02 |

¹ In den Banken A, C, E und F wurden TGA und CCG als Sonden verwendet. In der Bank G zusätzlich AGA.

3.3 Effizienz der Markerentwicklung

In den sequenzierten Plasmidklonen mit Dinukleotid-Motiv wurden 187, in denen mit Trinukleotid-Motiv 30 Mikrosatelliten gefunden. Darunter waren auch Motive nach denen nicht gesucht wurde. Das waren jeweils ein $(A)_n$ -, $(TA)_n$ -, $(TA)_n/(TAA)_n$ -, $(TTG)_n/(TGG)_n$ - und ein $(GAAAAAA)_n$ -Mikrosatellit.

Bei allen Mikrosatellitensequenzen wurden untersucht, ob sie für die weitere Markerentwicklung geeignet sind (Tab. 3.3). Dreizehn Dinukleotid-Motive waren so lang, daß eine Sequenzierung über den gesamten Mikrosatelliten auch mit einem flankierenden Primer nicht gelang. Auch die Sequenzierungen von der anderen Klonierungsseite reichten nicht bis zu den flankierenden Sequenzen. Nicht weiter verwendet wurden bei den Dinukleotid-Motiven 19 und bei den Trinukleotid-Motiven fünf Mikrosatelliten, weil sie weniger als zehn Wiederholungseinheiten aufwiesen. Beispielhaft wurden lediglich zwei Dinukleotid- und ein Trinukleotid-Mikrosatellit mit

sechs bzw. acht Wiederholungseinheiten weiter bearbeitet. Dies wurde durchgeführt um herauszufinden, ob die allgemeinen Aussagen über einen reduzierten Polymorphiegrad bei weniger als zehn Wiederholungseinheiten auch bei der Zuckerrübe zutreffen. Fehlende oder nicht ausreichende flankierende Sequenzen auf einer der beiden Seiten des Mikrosatelliten waren bei 20 bzw. acht Mikrosatelliten der Grund, warum aus ihnen kein Marker entwickelt werden konnte.

Beim Homologievergleich ergaben sich fünf GA-, fünf GT- und vier GT/TA-Mikrosatelliten, bei denen die flankierenden Sequenzen jeweils zu mindestens 90% homolog zu denen eines anderen Klones waren. Für das TGA-Motiv wurden keine Homologien größer 90% gefunden.

Im gleichen Arbeitsschritt wurden die flankierenden Sequenzen mit der Satelliten-DNA "BamHI" verglichen. Dabei zeigten 21 GT Mikrosatelliten (23%) eine Homologie von mehr als 90% und wurden daraufhin ausselektiert.

Anschließend konnten für 85 Dinukleotid- und 17 Trinukleotid- Mikrosatelliten flankierende Primer hergestellt werden. Es wurde versucht, die Primer so zu wählen, daß sich PCR-Fragmente zwischen 100 und 200 bp ergeben. In Folge von sehr langen Mikrosatelliten oder flankierenden Sequenzen mit sehr hohen oder niedrigen GC-Gehalt mußten teilweise Primerpaare mit größeren Fragmenten ausgewählt werden. Die erwarteten Fragmente lagen zwischen 73 und 363 bp.

Die Primerpaare wurden in einer PCR-Reaktion mit DNA des Genotyps der Bank getestet. Die PCR-Produkte wurden auf dem A.L.F. DNA-Sequenziergerät detektiert. Die Marker wurden als funktional definiert, wenn sie ein PCR-Produkt lieferten. Dies sollte der erwarteten Größe entsprechen und spezifisch sein. Unspezifische Marker zeigten einen Schmier oder sehr viele Amplifikationsprodukte, so daß der Mikrosatellitenlocus nicht identifiziert werden konnte.

Bei den Dinukleotid-Motiven zeigten 15 Marker keine und neun eine unspezifische Amplifikation. Drei Marker waren bei den Trinukleotid-Motiven nicht funktional und vier nicht spezifisch. Am Ende standen 60 funktionale Marker aus der Sichtung nach Dinukleotid-Motiven und elf Marker aus der nach Trinukleotid-Motiven zur Verfügung.

Tab. 3.3: Selektionskriterien bei der Entwicklung von funktionalen Markern aus den Mikrosatellitensequenzen bei Dinukleotid- und Trinukleotid-Motiven

| Eigenschaft | Dinukleotid-Motive | | Trinukleotid-Motive | |
|---|--------------------|-------|---------------------|-------|
| | Anzahl | % | Anzahl | % |
| Mikrosatelliten insgesamt | 187 | 100,0 | 30 | 100,0 |
| Mikrosatellit zu lang | 13 | 7,0 | - | - |
| Mikrosatellit zu kurz* | 19 | 10,2 | 5 | 16,7 |
| Mikrosatellit zu nah an der Klonierungsstelle | 20 | 10,7 | 8 | 26,7 |
| Duplikate | 29 | 15,5 | - | - |
| Satelliten-DNA "BamHI" | 21 | 11,2 | - | - |
| Nutzbare Mikrosatelliten | 85 | 45,5 | 17 | 56,7 |
| Funktionalität | | | | |
| Primer gesetzt | 85 | 100,0 | 17 | 100,0 |
| Funktional | 61 | 71,8 | 10 | 58,8 |

* Weniger als zehn Wiederholungseinheiten

3.4 Charakterisierung der funktionalen Mikrosatellitenmarker

Die Mikrosatelliten lassen sich nach ihrer Struktur in einfache perfekte, einfache imperfekte, zusammengesetzte perfekte und zusammengesetzte imperfekte aufteilen (WEBER 1990). In Abbildung 3.2 sind beispielhaft die Sequenzen von vier Mikrosatelliten dargestellt. Bei GZM 017 handelt es sich um ein perfektes (GT)_n-Motiv. Einen einfachen imperfekten (GA)_n-Mikrosatelliten enthält der Marker GZM 058. Fast perfekt ist das zusammengesetzte (GA)_n/(GTGA)_n-Motiv des Markers GZM 086. Nur die zweite GA-Wiederholungseinheit zeigt hier eine imperfekte Struktur. Als Beispiel für die Trinukleotid-Mikrosatelliten ist hier der Marker GZMT 021 mit einem einfachen perfekten TGA-Motiv aufgeführt. Hierbei handelt es sich um einen Mikrosatelliten mit nur sechs Wiederholungseinheiten.

| |
|--|
| <p>GZM 017</p> <p>TACTGTAGCAGCAGATAATGATATATGTCATGGTCTCCTCTTGTGTAGGTGGTGAAGACACTCCTCCGGATGAG CCAGCAACTCCAGGTCAAGGAAGGAAGTTTAAGAAAGGCAAGGGGTATGTTTCTAAGGTCTGAGATGGATATA TACTGAAGTTGCTGCACTTATTAATACATAATTATGCTTCCTAACTTTTTTAGTTTCATCTTTGAAGTTAGTGACT TAACGATTCTTAGTACATTCCCTTCCTTTTTTTTGA<u>TGAGACATTCTGGTACATT</u>CATTATTCCTTAAATAACCCCG AGCTATCCTATAACCGTGTTCCTCCGTTCTTTN NNAATTGCAACATTTTNANTTTTTTACTATT<u>CACAATTCACATTTTACTGTGTATGATGATC</u></p> |
| <p>GZM 058</p> <p>ACCAAAGCAAAAGAAGAAGGAATAAAGGTGCGCAGGTGAGG<u>TGGTTGTCGTCGCAAGTGGTGGCAGTCGACG</u> GTGAGGGACGGTGGTTTGATGAGGANGGGAGATTACTTGTTAAAGAANAATGTGTTGCTTGGGAAAGAAGAAA GAAAGCCGAAGGAGAGGAGGGC CGAAATTTTTGTGGGTGAGGAGAGAGAAAATATTATGTGAGAAAAATATAGGTTAATGAGTTTATATATATGT TTTTCTGTGGGCTTAGGAAAAGGTAATT<u>GGGCTCAGCTATAGTTGATGAG</u>GAGTAAAATTAGTGTGGATC</p> |
| <p>GZM 086</p> <p>GATCCTCTTGATCACCAATCCACTATGATGTGCTGCCGTCATAATCGTGAATAACAAGAGTTATTAATAA <u>ACTTCTAATGGAGTAAGAATGGAGAAAG</u> TGAGTGAGTGAGTGAGTGAGTGAGTGAGTGAGTGATGATTTTAGAGTATGAGGAGTCAATGTCAGCTAAAG AAAAATAAATCTAGGTTACAAATGTTCTATTTATACTTAACAATA<u>AATATTCTCCTGTAGCCG</u>TCCCAAGAAATA GGCCACGCCAACCTCCTGCTTAACCACTTCCTTCTTCTCTCAGCTACAAAGTCATGGGCCCGCTT</p> |
| <p>GZMT 021</p> <p>AATTTCTAGACAGAACTCAGATATATAACCAAGCATAAATTTGTATTGTACAAATATCTAGCACACATCATT TCACACACGAC<u>AGCCCTGTAATCAGTTTT</u>CATCAAATTTAATTTATTTAAAAACCTATTATGTGATGATGA TGATGATGATGTAATGACATGTATGAATACATGATGCAAGAACATGATGTAATGAGTTAGTGATTTACGTCA TAACTTTTAGAACTCTAATTAATCACTGTCAGTCTCTTCTAGATGCACGCATATTGCTTCCTTGC</p> |

Abb. 3.2: Nukleotidsequenzen (Leserichtung vom 5'- zum 3'-Ende) von vier Plasmidklonen aus denen die Marker GZM 017, 058, 086 und GZMT 021 entwickelt wurden (Mikrosatellitensequenz: **fett**, Primersequenzen: *kursiv* und unterstrichen)

In Abbildung 3.3 sind die Häufigkeiten der verschiedenen Mikrosatellitenmotive und Strukturen aller funktionalen Marker dargestellt. Diese umfassen 33 (GA)_n-, 16 (GT)_n- und neun zusammengesetzte (GA)_n/(GT)_n-Mikrosatelliten. Dabei gehen die (GA)_n/(GT)_n-Motive sowohl bei (GA)_n als auch bei (GT)_n mit in die Grafik ein. Außerdem sind acht (TGA)_n-Marker dargestellt. Sonstige Motive sind Wiederholungen, nach denen nicht gesucht, aber die zufällig gefunden wurden.

Die funktionalen Marker enthalten am häufigsten das $(GA)_n$ -Motiv. Es folgen $(GT)_n$ und dann $(TGA)_n$. Es ist zu erkennen, daß alle Motive in der Mehrzahl imperfekt und/oder zusammengesetzt auftreten. Beim $(GA)_n$ -Motive sind 60% einfach. Im Gegensatz dazu sind bei $(GT)_n$ - und $(TGA)_n$ -Mikrosatelliten nur 28 bzw. 38 % einfach. Beim $(TGA)_n$ -Motiv ist nur ein Mikrosatellit (12,5 %) perfekt. Für $(GA)_n$ und $(GT)_n$ liegt der Anteil perfekter Mikrosatelliten bei 33 und 36%.

$(GA)_n$ und $(GT)_n$ treten zusammengesetzt mit verschiedenen Mononukleotid-, Dinukleotid-, Trinukleotid-, Tetranukleotid- und Hexanukleotid-Motiven auf. Häufigstes begleitendes Motiv ist hier $(TA)_n$. Die zusammengesetzten $(TGA)_n$ -Mikrosatelliten sind alle mit $(ATA)_n$ verbunden. Die sonstigen Motive sind einfache perfekte oder zusammengesetzte imperfekte Mikrosatelliten. Siehe hierzu auch Tabelle 7.1 im Anhang.

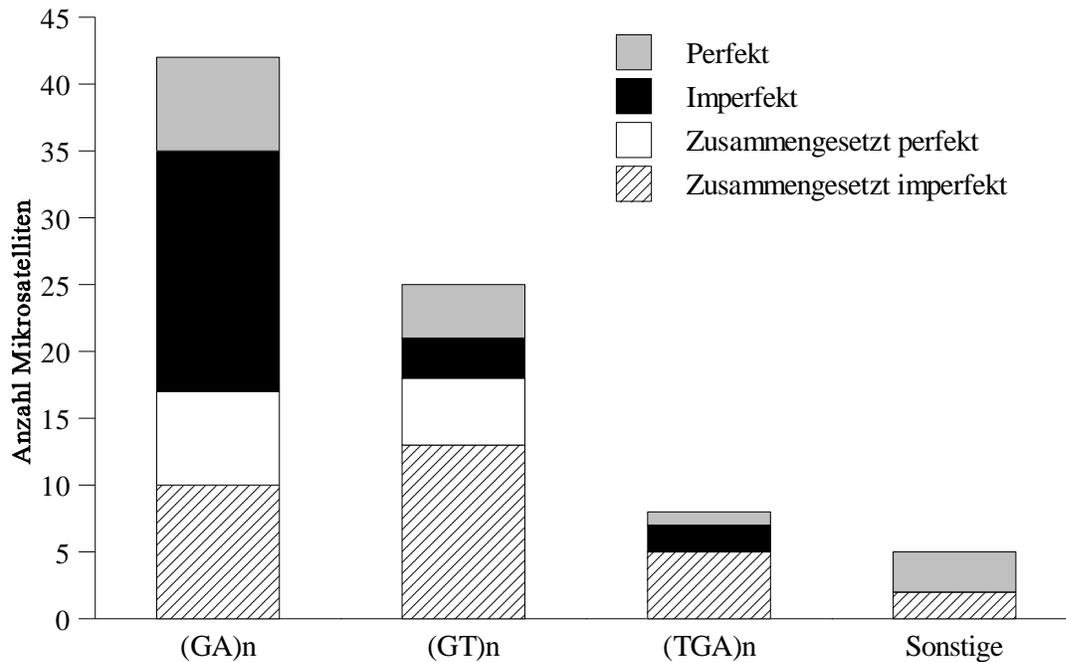


Abb. 3.3: Häufigkeiten der verschiedenen Mikrosatellitenmotive und Strukturen der funktionalen Marker (42 $(GA)_n$ -, 25 $(GT)_n$ -, acht $(TGA)_n$ - und fünf sonstige Mikrosatellitenmotive)

Ein weiteres Charakteristikum von Mikrosatelliten ist die Anzahl der Wiederholungseinheiten (Tab. 3.4). Auch hier gehen die acht $(GA)_n$ / $(GT)_n$ -Mikrosatelliten doppelt ein. Bei den einfachen Mikrosatelliten sind die $(GA)_n$ -Motive im Durchschnitt die längsten und die $(TGA)_n$ -Motive die kürzesten. Für die zusammengesetzten Mikrosatelliten ist es umgekehrt. Hier sind die $(GA)_n$ -

Motive die kürzesten und die (TGA)_n-Motive die längsten. Der Grund dafür ist, daß (TGA)_n immer mit (ATA)_n verbunden ist und daß (ATA)_n meist in sehr vielen Wiederholungseinheiten auftritt. Betrachtet man alle Mikrosatelliten der einzelnen Motivtypen gemeinsam, so wird aus Tabelle 3.4 deutlich, daß das (GT)_n-Motiv im Durchschnitt die meisten Wiederholungseinheiten hat. Als einfache Mikrosatelliten sind diese länger als die (TGA)_n-Motive. Im zusammengesetzten Zustand ist (GT)_n sehr häufig mit sehr langen Einheiten aus (TA)_n verbunden. Deshalb sind sie als zusammengesetzte Mikrosatelliten länger als die (GA)_n-Mikrosatelliten. Siehe hierzu auch im Anhang Tabelle 7.1.

Tab. 3.4: Mittlere (\bar{x}), minimale und maximale Anzahl der Wiederholungseinheiten bei einfachen und zusammengesetzten Mikrosatellitenmotiven und insgesamt

| Motiv | Anz. Marker | Einfach | | Zusammengesetzt | | Σ | |
|--------------------|-------------|-----------|------------|-----------------|------------|-----------|------------|
| | | \bar{x} | Spannweite | \bar{x} | Spannweite | \bar{x} | Spannweite |
| (GA) _n | 42 | 24 | 10-43 | 40 | 10-103 | 32 | 10-103 |
| (GT) _n | 25 | 19 | 6-41 | 45 | 20-103 | 39 | 6-103 |
| (TGA) _n | 8 | 15 | 6-28 | 47 | 22-85 | 33 | 6-85 |

3.5 Polymorphiegrad

Im Vortest hatten 71 der entwickelten Mikrosatellitenmarker mit der DNA des Genotyps der Bank das erwartete Fragment amplifiziert. Diese Marker wurden daraufhin mit 23 verschiedenen Linien auf ihren Polymorphiegrad hin untersucht. Dabei waren sieben der Dinukleotid-Marker monomorph, das heißt, sie amplifizierten in allen Genotypen ein Fragment gleicher Größe. Die Trinukleotid-Marker waren alle polymorph. Für die polymorphen Dinukleotid-Marker ergaben sich im Durchschnitt 4,9 Allele je Marker und für die Trinukleotid-Marker 4,8 Allele (Tab. 3.5). Die Anzahl Allele je Dinukleotid- oder Trinukleotid-Marker reichte dabei von 2 bis 13. Bei den Trinukleotid-Mikrosatellitenmarker zeigt sich eine sehr hohe Standardabweichung. Dies wird durch den Marker GZMT009 mit 13 Allelen verursacht. Alle anderen Marker in dieser Gruppe haben zwei, drei, vier oder fünf Allele. Als Allele wurden auch sogenannte Nullallele mit ausgewertet. Diese traten bei fünf verschiedenen Dinukleotid-Markern auf (siehe Anhang, Tab. 7.2). Dabei lag die Anzahl der Linien mit einem Nullallel zwischen 1 und 15. Die Trinukleotid-Marker zeigten keine Nullallele.

Für die Datensätze von polymorphen Markern ohne Fehlstellen wurden die PIC-Werte berechnet. Das sind 35 Dinukleotid- und fünf Trinukleotid-Marker. Für die Dinukleotid-Marker lag der PIC-Wert bei durchschnittlich 0,58 und für die Trinukleotid-Marker bei 0,52 (Tab. 3.5).

Tab. 3.5: Anzahl Allele je Marker und PIC-Werte mit der Anzahl jeweils untersuchter Marker (n), den Mittelwerten (\bar{x}) und Mini- und Maximalwerten bei Dinukleotid- und Trinukleotid-Mikrosatelliten (MS)

| Markertyp | Allele | | | PIC-Wert | | |
|-----------------|--------|-----------|------------|----------|-----------|-------------|
| | n | \bar{x} | Spannweite | n | \bar{x} | Spannweite |
| Dinukleotid-MS | 54 | 4,9 | 2 - 11 | 35 | 0,58 | 0,17 - 0,84 |
| Trinukleotid-MS | 10 | 4,8 | 2 - 13 | 5 | 0,52 | 0,29 - 0,86 |
| Gesamt | 64 | 4,9 | 2 - 13 | 40 | 0,58 | 0,17 - 0,86 |

Für die Berechnung und graphische Darstellung der genetischen Ähnlichkeiten wurden 48 polymorphe Mikrosatellitenmarker mit 238 verschiedenen Allelen ausgewählt. Der Datensatz beinhaltet 72 Fehlstellen. Das resultierende Dendrogramm ist in Abbildung 3.4 dargestellt. Mit 0,76 zeigt die kophänetische Korrelation eine schlechte Übereinstimmung zwischen den Dendrogrammwerten und den tatsächlichen genetischen Ähnlichkeiten.

Die mittlere genetische Ähnlichkeit liegt bei 0,27. Die Linien ZR9-L10 und ZR9-L22 zeigen mit 0,12 die geringste genetische Ähnlichkeit. Für die Linien ZR9-L08 und ZR9-L09 ergibt sich die höchste genetische Ähnlichkeit mit einem Wert von 0,62. Es ist zu erkennen, daß die Linie ZR9-L22 klar von den anderen Linien getrennt wird. Außerdem bilden die Linien ZR9-L03, -L04, -L20 und -L23 eine Gruppe. Diese Linien stammen aus nordamerikanischem Zuchtmaterial, das aus abgegebenen Linien des USDA (United States Department of Agriculture) entwickelt wurde. Darüber hinaus kann man eine Klusterung von monogermen (ZR9-L05 bis -L10) und multigermen (ZR9-L12 bis -L18) Linien erkennen.

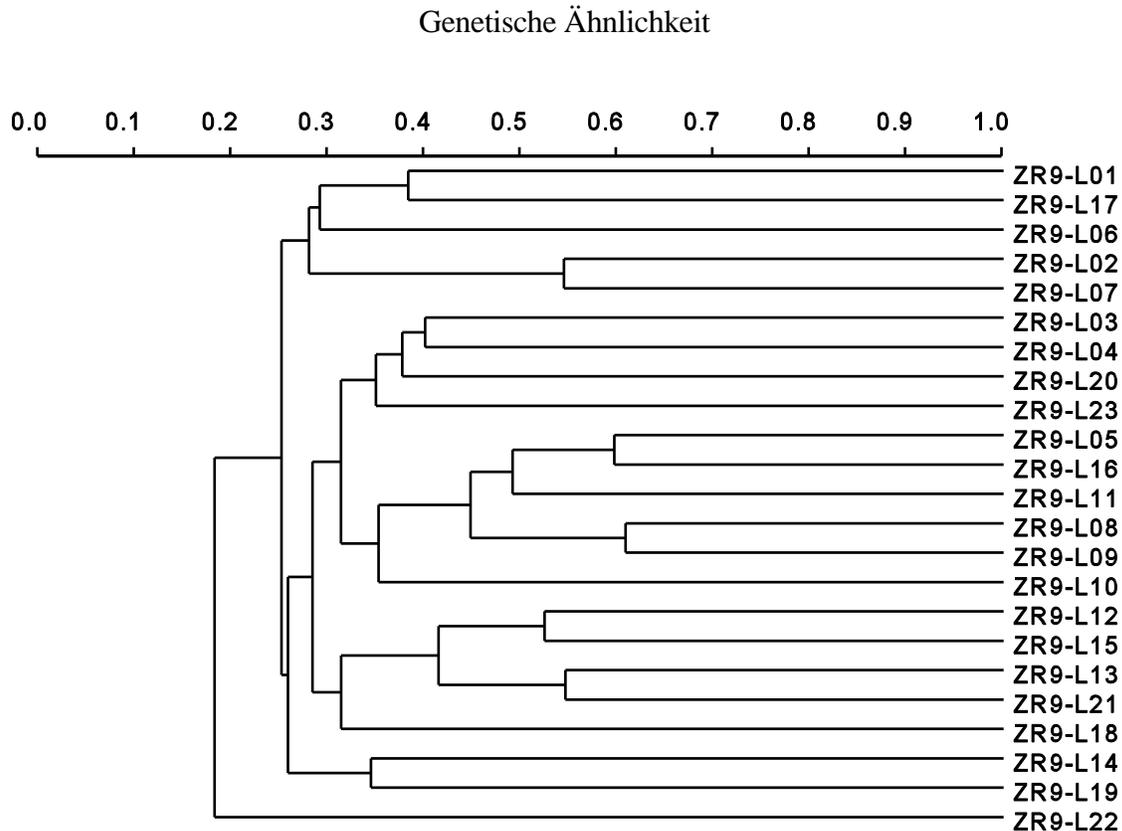


Abb. 3.4: Dendrogramm von 23 Linien basierend auf 48 polymorphen Mikrosatellitenmarkern mit insgesamt 238 Allelen

In Abbildung 3.5 ist beispielhaft der Polymorphismus des Markers GZM 086, wie er sich als Ergebnis aus dem Computerprogramm A.L.F. Fragmentmanager darstellen, aufgezeigt. Die Nukleotidsequenz dieses Markers findet sich in Abbildung 3.2.

Es zeigen sich für GZM 086 sieben verschiedene Allele innerhalb der 23 Linien. Diese haben Fragmentgrößen von 158, 163, 176, 178, 183, 191 und 205 bp. Einige der Linien sind an diesem Locus heterogen, d.h. sie zeigen zwei unterschiedliche Allele (z.B. ZR9-L04, ZR9-L07 oder ZR9-L12). Dabei treten bei einigen Genotypen quantitative Unterschiede in der Signalintensität der Allele auf (z.B. ZR9-L03 oder ZR9-L06).

Bei der Detektion von PCR-Fragmenten, basierend auf Mikrosatellitensequenzen, treten häufig sogenannte Stotter- oder Schattenbanden auf (LITT et al. 1993). Diese sind um eine oder mehrere Wiederholungseinheiten kleiner als das Hauptfragment. Dabei tritt dieser Effekt bei Dinukleotid-Motiven wesentlich stärker in Erscheinung als bei Trinukleotid-Motiven. Dadurch ist die Unterscheidung von Allelen mit einem Fragmentlängenunterschied von nur zwei bp sehr schwierig. Besonders ergeben sich diese Probleme im heterogenem Zustand. Durch den Einsatz

der A.L.F.-DNA Sequenziergeräte konnten solche Polymorphismen leichter ausgewertet werden (BREDEMEIJER et al. 1998). Das Auftreten von Stotterbanden ist nicht immer gegeben. In dem Beispiel aus Abbildung 3.5 ergab sich eine saubere Amplifikation.

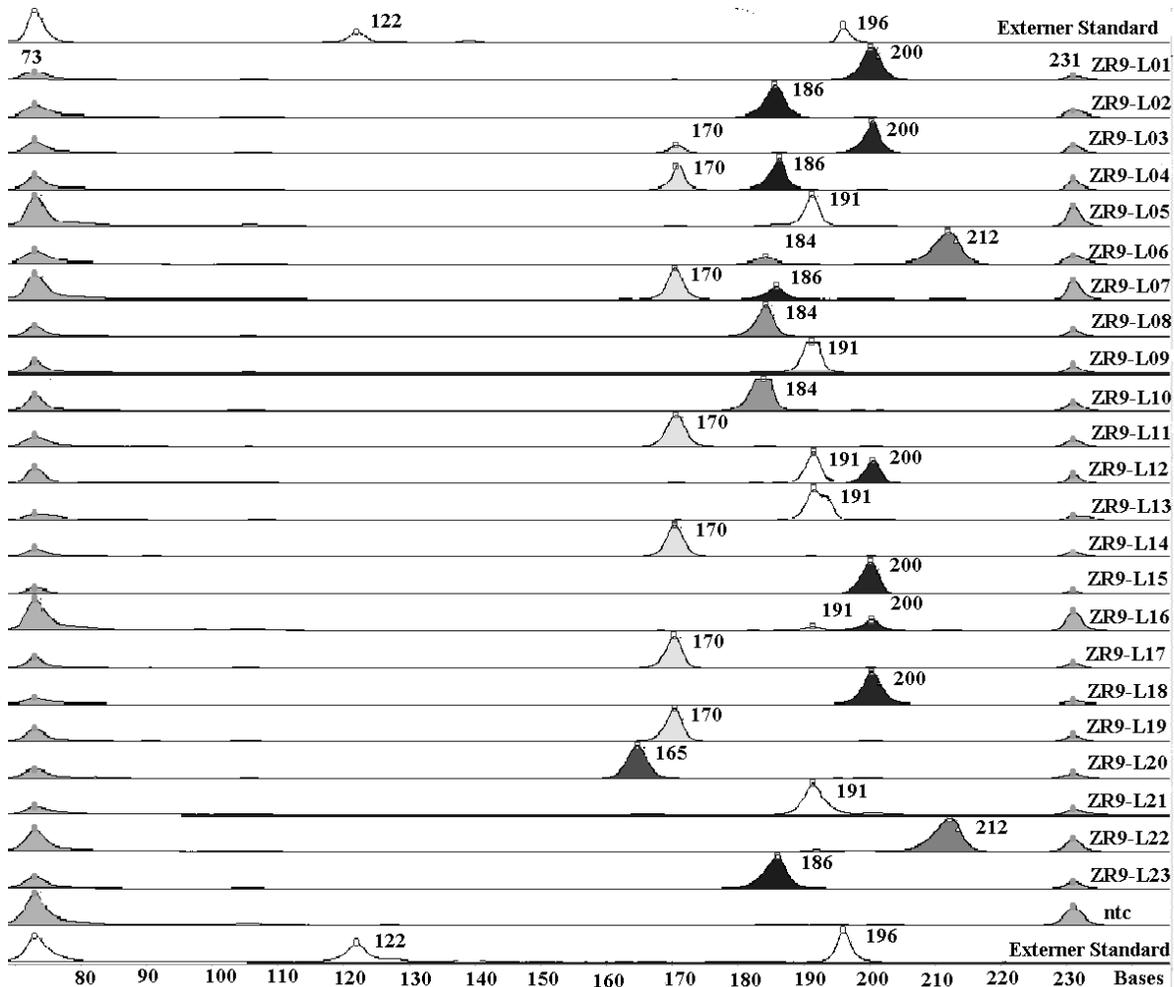


Abb. 3.5: Detektierte PCR-Fragmente des Mikrosatellitenmarkers GZM 086 in 23 Linien, mit der Angabe ihrer Größen in bp, und der Negativkontrolle (ntc) mit den internen Standards 73 bp und 231 bp und in der ersten bzw. letzten Spur externe Standards mit den Größen 73, 122 und 196 bp.

In Abbildung 3.6 sind für die Mikrosatellitenmarker aus Abbildung 3.2 die Allelfrequenzen der Größe nach graphisch dargestellt. Bei GZM017 sind die beiden mittelgroßen Fragmente mit Frequenzen von 0,39 und 0,35 die häufigsten. Die größten und kleinsten Allele kommen am seltensten vor (Allelfrequenzen 0,04 und 0,02). Das kleinste Fragment hat beim Marker GZM058 mit 0,61 bei weitem die höchste Allelfrequenz. Bei GZM086 liegen die Frequenzen im Bereich von 0,04 und 0,24. Die beiden Allele von GZMT021 traten mit Frequenzen von 0,3 und 0,7 auf.

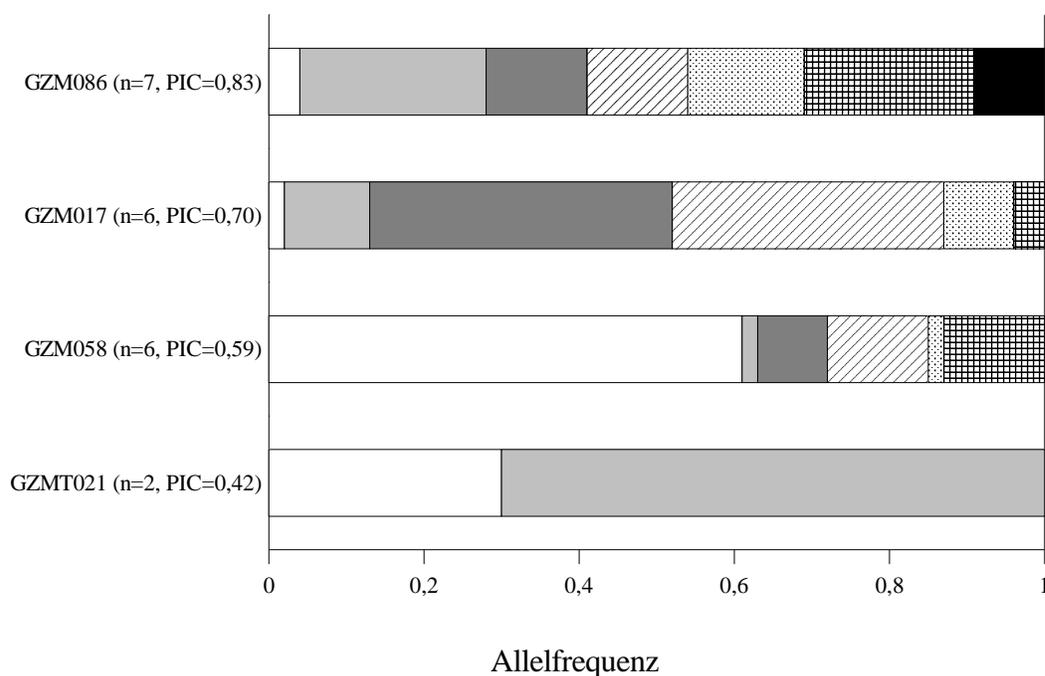


Abb. 3.6: Allelfrequenzen für die Mikrosatellitenmarker GZM086, GZM017, GZM058 und GZMT021 sortiert innerhalb jedes Markers nach den Fragmentgrößen der Allele aufsteigend von links nach rechts und der Anzahl Allele (n) und den PIC- Werten, basierend auf 23 Zuckerrübenlinien

3.6 Polymorphievergleich zwischen Mikrosatelliten-, RFLP- und AFLP-Markern

Da für die RFLP- und AFLP-Marker bereits Datensätze der neun Linien mit fünf Einzelpflanzen zur Verfügung standen, mußte hier nur noch die Analyse der Mikrosatellitenmarker durchgeführt werden. Es wurden 41 polymorphe Marker ausgewählt und diese zur Differenzierung der Linien und Einzelpflanzen genutzt.

In Abbildung 3.7 A-C sind die Dendrogramme der 45 bzw. 44 Einzelpflanzen, basierend auf den drei Markertypen, dargestellt. Die kophänetischen Korrelationen zeigen mit 0,97 (Mikrosatelliten), 0,95 (RFLP) und 0,95 (AFLP) eine sehr gute Übereinstimmung zwischen der Darstellung der Dendrogramme und den genetischen Ähnlichkeiten im paarweisen Vergleich.

Die fünf Einzelpflanzen jeder Linie bilden, bis auf eine Ausnahme, immer eine Gruppe. In der RFLP-Analyse zeigen die Pflanzen ZR6-7B, -7D und -7E eine größere genetische Ähnlichkeit zu der Linie ZR6-9 als zu den Pflanzen ZR6-7A und -7C. In allen anderen Fällen konnte zwischen den Linien differenziert werden. Bei allen Markertypen gab es Einzelpflanzen zwischen denen nicht differenziert werden konnte. Dies war jedoch bei jedem Markertyp in unterschiedlichen Linien der Fall.

Im Mittel ist die genetische Ähnlichkeit zwischen den Linien für die Mikrosatellitenmarker wesentlich geringer als für die AFLP- und RFLP-Marker (Tab. 3.6). Allerdings ist die Spannweite der genetischen Ähnlichkeiten bei den Mikrosatellitenmarkern am größten. Es ergeben sich zwischen den Linien ZR6-5 und ZR6-8 die höchsten und zwischen den Linien ZR6-1 und ZR6-9 die geringsten genetischen Ähnlichkeiten.

Innerhalb der Linien sind die Unterschiede zwischen den Markertypen nicht deutlich. Bei den Minimal- und Maximalwerten ergeben sich nur sehr geringe Unterschiede. Die höchste genetische Ähnlichkeit zwischen den Einzelpflanzen besteht innerhalb der Linien ZR6-8 und ZR6-9 bei der RFLP-Analyse. Damit wird bestätigt, daß die Linien ZR6-8 und ZR6-9 aus Kloneinzelpflanzen vermehrt wurden und deshalb eine hohe Homogenität erwarten lassen. Dies wird bei allen drei Markertypen deutlich. Die beiden Linien zeigen geringe genetische Distanzen innerhalb der Linie. Allerdings sind teilweise innerhalb der S_2 -Linien ZR6-3 und ZR6-5 die genetischen Ähnlichkeiten ebenfalls vergleichbar gering.

Die Korrelation der genetischen Ähnlichkeiten war zwischen Mikrosatelliten- und RFLP-Markern 0,86. Im Vergleich der Mikrosatelliten- mit den AFLP-Markern ergab sich eine Korrelation von 0,91 und zwischen RFLP- und AFLP-Markern 0,85. Alle Korrelationen waren hoch signifikant bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $P < 0,01$.

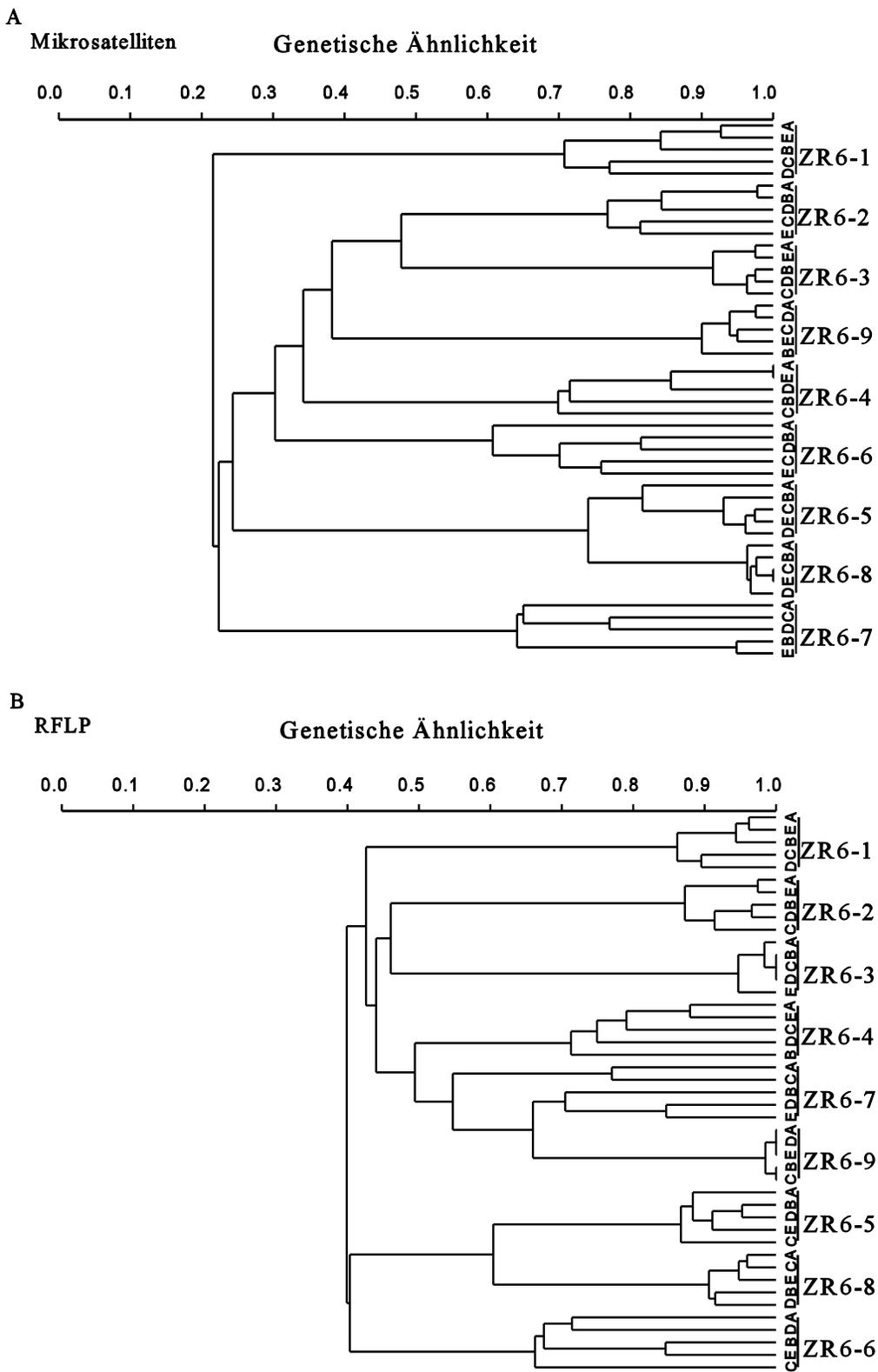
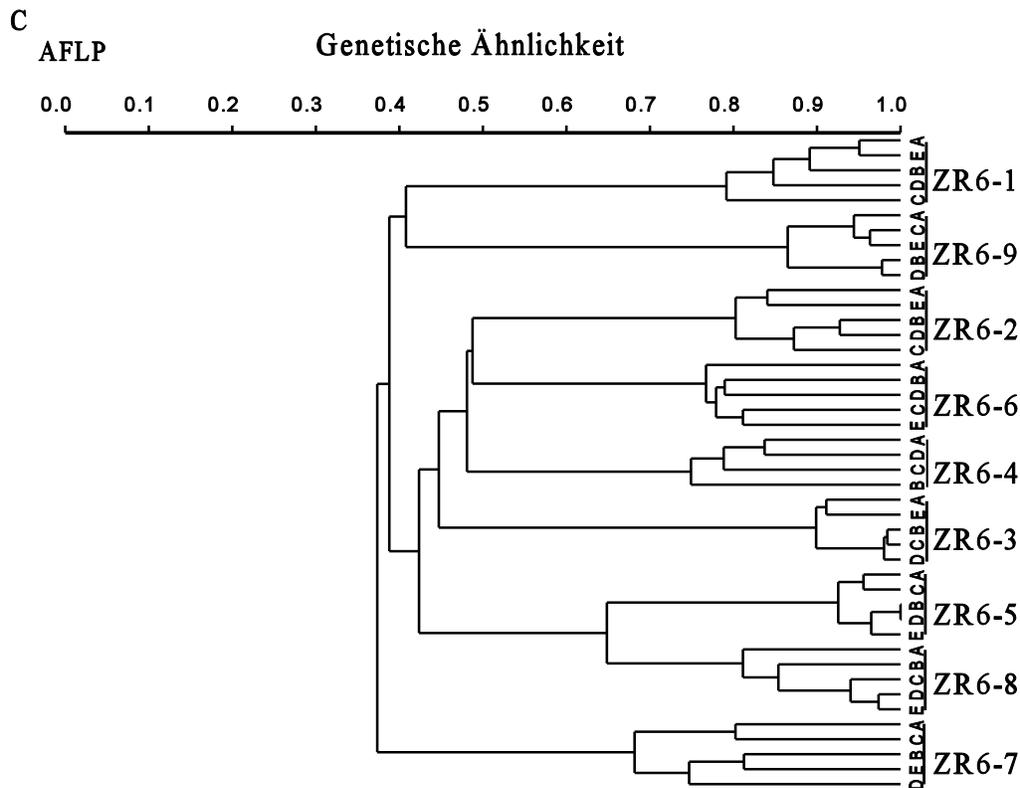


Abb. 3.7: Dendrogramme der genetischen Ähnlichkeiten von neun Linien mit je fünf Einzelpflanzen für Mikrosatelliten-, RFLP- und AFLP-Marker (Seite 41 und 42 oben)



Fortsetzung Abb. 3.7

Tab. 3.6: Mittlere (\bar{x}), minimale und maximale genetische Ähnlichkeiten mit ihren Standardabweichungen zwischen und innerhalb der Linien bei Mikrosatelliten-, AFLP- und RFLP-Markern

| Parameter | Mikrosatelliten | AFLP | RFLP |
|------------------------------|-----------------|------|------|
| Zwischen Linien | | | |
| \bar{x} genet. Ähnlichkeit | 0,28 | 0,41 | 0,43 |
| Min. genet. Ähnlichkeit | 0,16 | 0,32 | 0,32 |
| Max. genet. Ähnlichkeit | 0,74 | 0,65 | 0,60 |
| Standardabweichung (s) | 0,11 | 0,06 | 0,06 |
| Innerhalb Linien | | | |
| \bar{x} genet. Ähnlichkeit | 0,83 | 0,84 | 0,86 |
| Min. genet. Ähnlichkeit | 0,68 | 0,72 | 0,69 |
| Max. genet. Ähnlichkeit | 0,97 | 0,94 | 0,99 |
| Standardabweichung (s) | 0,11 | 0,07 | 0,11 |

3.7 Genetische Kartierung

Anhand der zur Verfügung stehenden RFLP- und STS-Markerinformationen konnte für beide Populationen eine Gerüstkarte über alle neun Chromosomen erstellt werden. In dieses Gerüst wurden die Mikrosatellitenmarker eingefügt.

In der 9502-Population waren 17 Marker zwischen den Eltern polymorph und konnten kartiert werden (Tab. 3.7). Zwischen den Eltern der 9704-Population waren 33 Marker polymorph. Darunter waren auch alle kartierten Marker der 9502-Population. Die 16 verbleibenden unkartierten Marker wurden in der 9704-Population kartiert. Die Marker GZM008, GZM059 und GZM068 wurden in beiden Populationen untersucht. Insgesamt ergeben sich 33 kartierte Mikrosatellitenmarker (Abb. 3.8). Außer auf Chromosom VIII kartiert auf allen Chromosomen mindestens ein Mikrosatellit.

Auf den Chromosomen IV und VI zeigen sich Gruppen von Mikrosatellitenmarkern, die dicht zusammen kartieren. Jedoch kartiert kein Mikrosatellitenmarker ohne Rekombination zu einem anderen Marker.

In der 9704-Population traten bei dem Elter ZR9-L22 teilweise Nullallele auf, so daß die Marker GZM008, GZM028, GZM029, GZM078 und GZM087 nur dominant ausgewertet werden konnten.

In Tabelle 3.7 sind die kartierten Marker mit ihren Spaltungsverhältnissen und den dazugehörigen χ^2 -Werten aufgeführt. Es zeigt sich, daß fast alle Marker auf den Chromosom IV und V signifikant von dem erwarteten Spaltungsverhältnissen 1:2:1 bzw. 3:1 abweichen. Eine Homozygotenklasse ist dort stark unterrepräsentiert. Auch der Marker GZM041 auf Chromosom IX zeigt eine ähnliche Abweichung von der erwarteten Spaltung. Eine überrepräsentierte Heterozygotenklasse tritt bei einigen Marker von Chromosom IV in der 9502-Population auf. Gleiches gilt für den Marker GZM020 von Chromosom VII ebenfalls in der 9502-Population und den Marker GZM086 von Chromosom III in der 9704-Population.

Tab. 3.7: Kartierte Marker in der 9502- und 9704-Population mit ihren Chromosomenpositionen, Spaltungsverhältnissen und χ^2 -Werten, Marker die in beiden Populationen kartiert wurden sind durch Fettdruck hervorgehoben

| 9502-Population | | | | 9704-Population | | | |
|-----------------|-----------|----------------|------------------|-----------------|-----------|----------------|------------------|
| Marker | Chr. | Spaltung | χ^2 -Test | Marker | Chr. | Spaltung | χ^2 -Test |
| GZM003 | VI | 10:47:22 | 6,49** | GZM008 | IV | 90:29 | 0,03 |
| GZM008 | IV | 9:47:22 | 7,62** | GZM010 | VI | 24:64:28 | 1,52 |
| GZM014 | VI | 15:43:20 | 1,46 | GZM028 | IX | 85:27 | 0,05 |
| GZM017 | VI | 11:48:20 | 5,71* | GZM029 | V | 108:10 | 17,19**** |
| GZM020 | VII | 15:50:12 | 7,10** | GZM041 | IX | 48:49:20 | 16,49**** |
| GZM024 | IV | 23:45:11 | 5,18* | GZM051 | I | 29:62:28 | 0,23 |
| GZM030 | IV | 10:54:15 | 11,28**** | GZM052 | VI | 24:63:33 | 1,65 |
| GZM038 | III | 23:35:15 | 1,88 | GZM059 | V | 6:55:55 | 41,71**** |
| GZM053 | IV | 8:51:15 | 11,92**** | GZM068 | V | 7:52:60 | 49,10**** |
| GZM058 | IV | 10:53:14 | 11,34**** | GZM071 | IV | 25:67:28 | 1,78 |
| GZM059 | V | 26:46:5 | 14,38**** | GZM072 | IV | 20:57:26 | 187 |
| GZM060 | III | 26:36:17 | 2,67 | GZM078 | I | 88:31 | 0,07 |
| GZM063 | I | 18:46:13 | 3,57 | GZM086 | III | 19:74:22 | 9,63**** |
| GZM066 | VI | 14:41:19 | 1,54 | GZM087 | VII | 81:38 | 3,05* |
| GZM068 | V | 25:42:1 | 6,48** | GZM106 | VII | 31:53:35 | 1,69 |
| GZM091 | I | 16:42:21 | 0,95 | GZMT005 | IV | 20:69:29 | 4,76* |
| GZMT021 | I | 16:45:18 | 1,63 | GZMT009 | IV | 26:69:23 | 3,54 |
| | | | | GZMT014 | I | 24:45:23 | 0,07 |
| | | | | GZMT026 | 2 | 23:43:27 | 0,87 |

*, **, ***, **** Signifikante Abweichung von der erwarteten Spaltung (1:2:1 bzw. 3:1) bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,1, 0,05, 0,01 bzw. 0,005

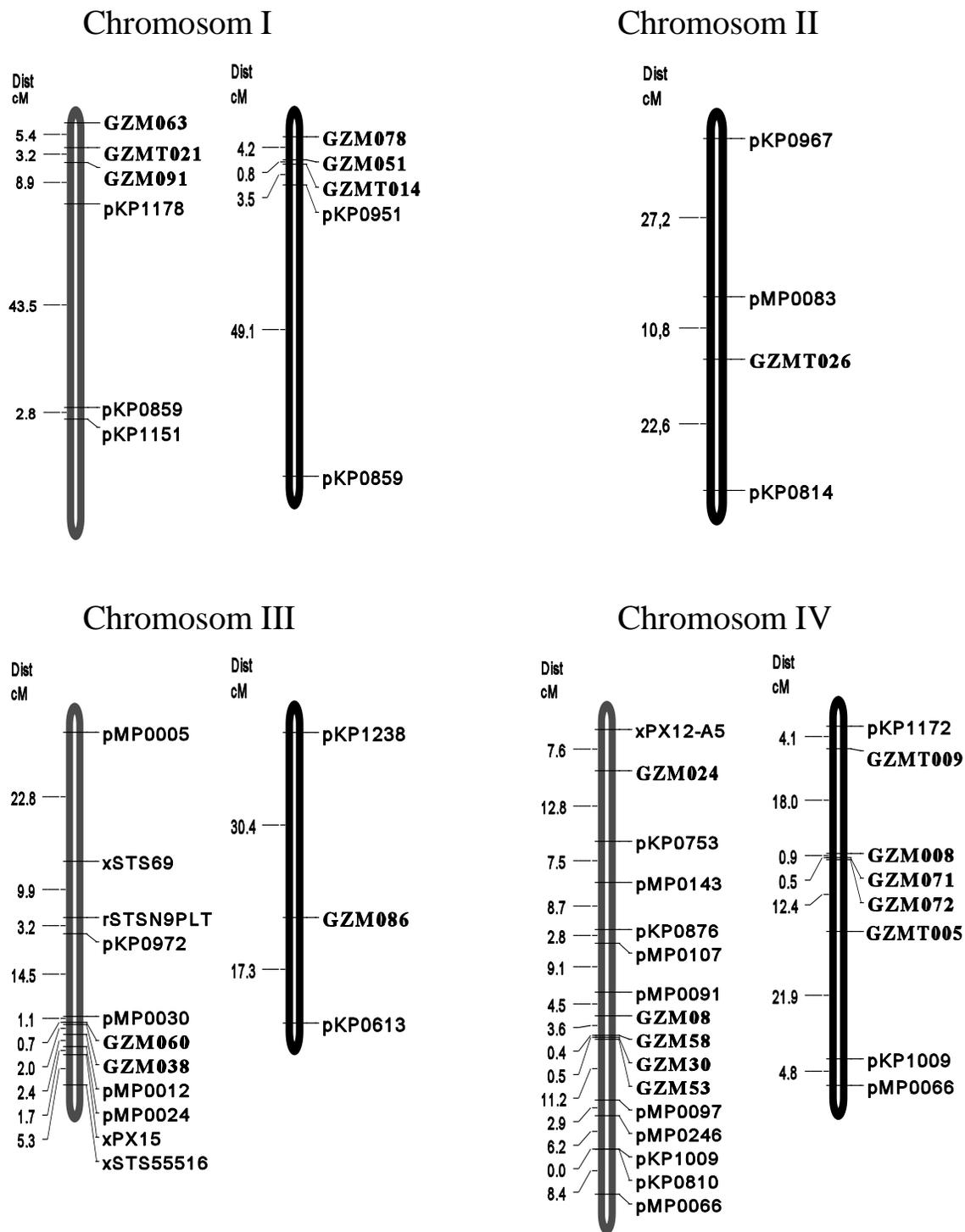
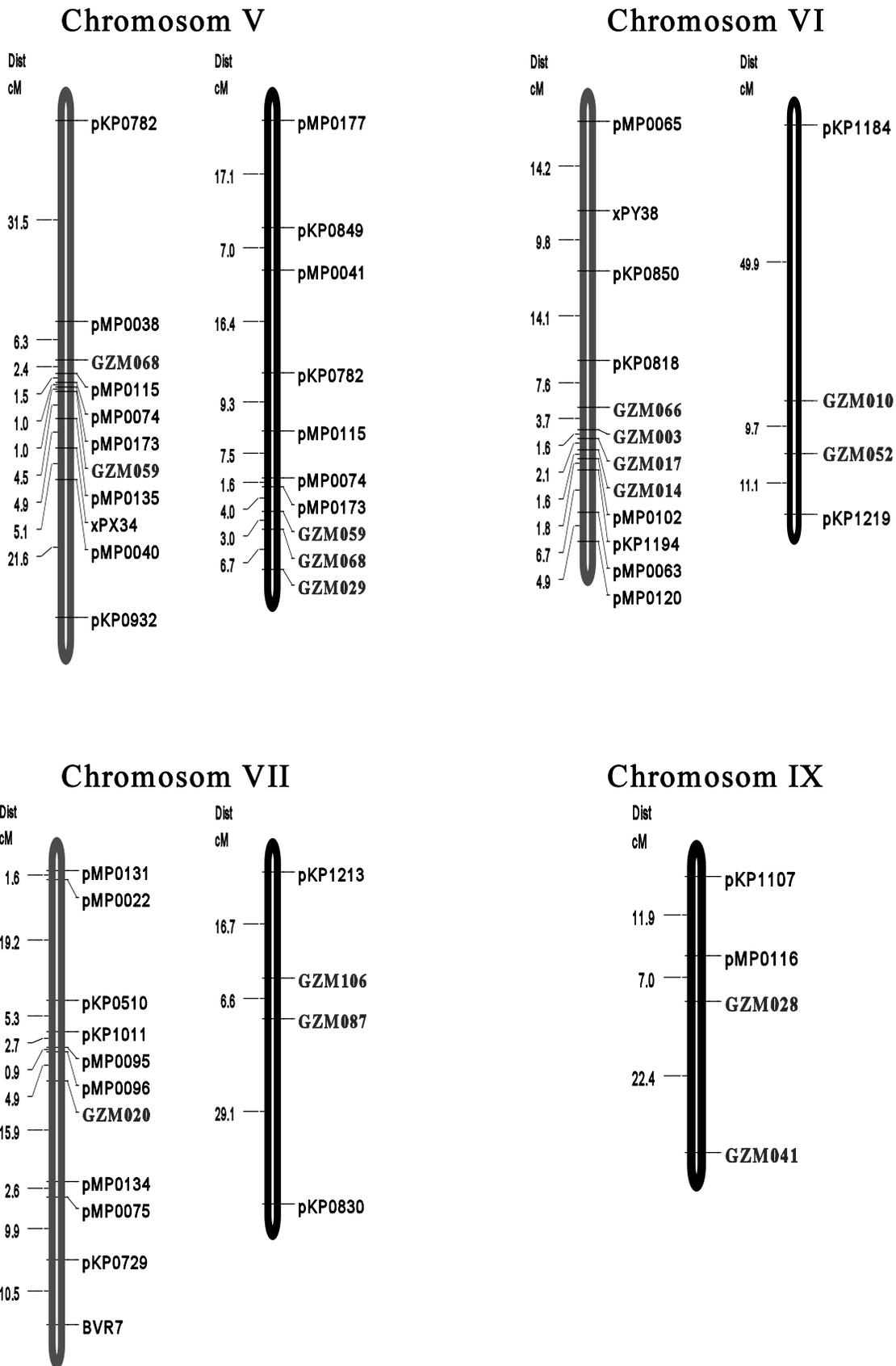


Abb. 3.8: Genetische Karte der Zuckerrübenchromosomen I bis VII und IX mit 73 Referenz-RFLP- und STS-Markern und 33 integrierten Mikrosatellitenmarkern (GZM bzw. GZMT), graue Chr.: 9502-Population, schwarze Chr.: 9704-Population (Seite 45 und 46)



Fortsetzung Abb. 3.8

4 Diskussion

4.1 Markerentwicklung

4.1.1 Methode der Mikrosatellitenisolierung

Um einen funktionalen Mikrosatellitenmarker zu entwickeln, benötigt man eine Mikrosatellitensequenz mit ausreichend langen flankierenden Sequenzen zur Ableitung spezifischer PCR Primer. Solche Sequenzen kann man beispielsweise dadurch erhalten, daß man öffentliche Sequenzdatenbanken nach Mikrosatellitenmotiven durchsucht. Dieses Vorgehen führt schnell und kostengünstig zu Mikrosatellitensequenzen. Für die Zuckerrübe ist jedoch nur eine sehr geringe Anzahl von genomischen Sequenzen in den Datenbanken vorhanden. Dadurch läßt sich nur eine sehr begrenzte Anzahl an Mikrosatellitensequenzen isolieren. Auf diesem Wege wurden bereits einige wenige Zuckerrübenmikrosatelliten von GROBEN (1998) entwickelt.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Mikrosatelliten aus genomischen Phagenbanken isoliert. Es wurde ein Phagenvektor benutzt, da in dieser Form die Banken einfacher und schneller zu sichten sind als in Plasmidvektoren. Außerdem wurden die zu ligierenden Fragmente auf Größe selektiert. Dadurch entstanden Ligationsfragmente von durchschnittlich 900 bp. Bei dieser Größe konnte meist die gesamte Nukleotidsequenz der Fragmente mit zwei Sequenzreaktionen erfaßt werden, so daß kein Subklonieren der Fragmente notwendig war.

Um die Anzahl zu sichtender Klone zu reduzieren, werden genomische Banken teilweise für die gesuchten Mikrosatellitenmotive angereichert. Sowohl eine Anreicherung vor als auch nach der Klonierung ist möglich. Nach OSTRANDER et al. (1992) erfolgt die Anreicherung nach der Klonierung über zirkuläre und einzelsträngige Phagemid DNA. Durch eine Polymerasereaktion mit einem Primer aus dem Mikrosatellitenmotiv werden die gesuchten Moleküle doppelsträngig. Diese doppelsträngigen Phagemide werden dann selektiv propagiert. Andere Methoden zur Anreicherungen nach der Klonierung basieren auf der Ausbildung von dreisträngigen DNA-Komplexen (ITO et al. 1992, RIGAS et al. 1986).

Die Anreicherung vor der Klonierung geschieht meist über PCR. Dabei werden zuerst alle Fragmente durch die bekannten Sequenzen der anhängender Adaptatoren amplifiziert. Die Selektion der mikrosatellitenträgenden Fragmente kann anschließend über eine Hybridisierung

an membrangebundene Oligonukleotide erfolgen (KARAGYOZOV et al. 1993, EDWARDS et al. 1996). Eine andere Selektionsmethode arbeitet mit an Biotin gebundenen Oligonukleotiden, die, nachdem sie mit den Mikrosatelliten hybridisiert wurden, über Affinitätschromatographie isoliert werden (KANDPAL et al. 1994, KIJAS et al. 1994).

Die Nutzung angereicherter Banken birgt den Nachteil, daß ein mehr oder weniger hoher Anteil der isolierten Mikrosatelliten redundant ist. Dies kann erst nach der Sequenzierung festgestellt werden. Dadurch ergibt sich ein höherer Sequenzieraufwand je funktionalem Marker. Außerdem müssen ständig die neu isolierten Nukleotidsequenzen sehr genau auf Redundanz zu bereits bestehenden Mikrosatellitenmarkern geprüft werden. Diese Punkte können dazu führen, daß der geringere Aufwand für die Sichtung der Bank durch erhöhten Sequenzieraufwand wieder ausgeglichen wird.

In der vorliegenden Arbeit wurden 6% redundante Mikrosatelliten isoliert. Dabei wurden die hier verwendeten Banken nicht für Mikrosatelliten angereichert. Das kleine Genom der Zuckerrübe und damit eine relativ geringe absolute Anzahl an Mikrosatelliten könnte der Grund für diese Redundanz sein. Beim Weizen erwiesen sich mit dem gleichen Ansatz von 230 funktionalen Mikrosatellitenmarkern nur zwei als redundant (RÖDER et al. 1998).

Unter der Berücksichtigung dieser Ergebnisse wäre die Nutzung von angereicherten Banken bei der Zuckerrübe, und eventuell auch bei anderen Pflanzenarten mit kleinen Genomen, sehr kritisch zu sehen. Wahrscheinlich würde sich keine höhere Zeit- und Kosteneffizienz bei der Mikrosatellitenentwicklung ergeben.

4.1.2 Abundanzen der Mikrosatellitenmotive im Vergleich zu anderen Pflanzenarten

Die Entwicklung von Mikrosatellitenmarkern ist im Vergleich zu anderen Markertypen sehr teuer und aufwendig. Aus diesem Grund sind Vorinformationen über die Häufigkeit der verschiedenen Mikrosatellitenmotive im Genom von Vorteil. Dadurch kann der Isolierungsprozess optimiert werden. Außerdem kann daraus die potentiell zur Verfügung stehende Anzahl an Mikrosatellitenmarkern ermittelt werden. Für Projekte, in denen Mikrosatelliten in einer sehr großen Anzahl isoliert werden, sind solche Informationen sehr wichtig.

Die Abschätzung der Abundanzen der einzelnen Motive geschah hier durch die Erfassung des Anteils positiver Klone einer genomischen Bank. Die gewonnenen Ergebnisse werden im Folgenden vergleichbaren Untersuchungen an anderen Objekten gegenübergestellt. Außerdem werden auch Befunde, die auf Datenbankrecherchen beruhen, mit einbezogen. Dabei muß beachtet werden, daß in diesen Datenbanken vorwiegend transkribierte Sequenzen vorhanden sind, so daß man hierbei nicht unbedingt auf die Häufigkeiten im Gesamtgenom schließen kann.

Für die Mikrosatellitenmotive $(GA)_n$ und $(GT)_n$ wurden in dieser Arbeit Häufigkeiten von einem Mikrosatelliten pro 225 kb im Genom von *Beta vulgaris* ermittelt. Daraus ergeben sich bei einer haploiden Genomgröße von 758×10^6 bp (ARUMUGANATHAN und EARLE 1991) etwa 3370 $(GA)_n$ - bzw. $(GT)_n$ -Mikrosatelliten im Genom von *Beta vulgaris*. Dabei muß berücksichtigt werden, daß es sich hierbei nur um eine sehr grobe Abschätzung handelt. Die Wahl der Restriktionsenzyme für die genomischen Banken, die Insertgröße und die Hybridisierungsbedingungen können diese Abschätzung entscheidend beeinflussen. Der Einfluß der Hybridisierungsbedingungen wurde von PANAUD et al. (1995) bei Reis genauer untersucht. Ebenfalls bei Zuckerrübe fanden MÖRCHEN et al. (1996) gleiche Abundanzen für $(GA)_n$ und $(GT)_n$ in einer Plasmidbank. Bei *Arabidopsis* (BELL und ECKER 1994), Weizen (RÖDER et al. 1995), Gerste (LIU et al. 1996), Raps (LAGERCRANTZ et al. 1993, KRESOVICH et al. 1995) und bei tropischen Bäumen (CONDIT und HUBBELL 1990) wurden ebenfalls ähnliche Häufigkeiten beobachtet. Unterschiedliche Ergebnisse ergaben sich bei Tomate. So fanden ARESHCHENKOVA und GANAL (1999) gleiche Häufigkeiten wie bei Zuckerrübe. Geringere Frequenzen von Mikrosatelliten (alle 1200 kb) fanden dagegen BROUN und TANKSLEY (1996) in Phagenbanken mit großen Insertionen bei Tomate. Gründe für diese unterschiedlichen Ergebnisse liegen wahrscheinlich in den Isolierungsmethoden. Bei der Sichtung von genomischen Banken mit kleinen Insertionen werden die Häufigkeiten in der Regel höher geschätzt als bei großen Insertionen. Geringere Häufigkeiten als bei Zuckerrübe fanden TARAMINO und TINGEY (1996) bei Mais und SUN et al. (1998) bei *Elymus*. Hier sind die Isolierungsmethoden allerdings sehr ähnlich mit denen bei Zuckerrübe, so daß die Unterschiede wahrscheinlich allein auf den Häufigkeiten in den Genomen beruhen.

Unter den mikrosatellitenträgenden Sequenzen war der Anteil an $(GA)_n$ - und $(GT)_n$ -Mikrosatelliten in den hier beschriebenen Ergebnissen etwa gleich. Berücksichtigt man die mehrfache Isolierung der Satelliten-DNA *Bam*HI, dann wurden etwa 20% weniger $(GT)_n$ - als

(GA)_n-Mikrosatelliten isoliert. Auch in den oben zitierten Untersuchungen bei Zuckerrübe (GROBEN 1998, MÖRCHEN et al. 1996) wurde ein höherer Anteil an (GA)_n-Motiven festgestellt. Durch die geringe Anzahl an isolierten Klonen war in diesen Arbeiten eine sichere Abschätzung der Verhältnisse jedoch nicht möglich. Aus Datenbankuntersuchungen (LAGERCRANTZ et al. 1993, MORGANTE und OLIVIERI 1993) ist bekannt, daß (GA)_n-Mikrosatelliten in Pflanzengenomen meist häufiger sind als (GT)_n-Mikrosatelliten. Allerdings gibt es, wenn man die Pflanzenarten einzeln betrachtet, Unterschiede. Das GA:GT Verhältnis ist zum Beispiel bei Weizen 5:3 (RÖDER et al. 1995), bei Reis 2:1 (WU und TANKSLEY 1993) und Raps 5:1 (KRESOVICH et al. 1995). In etwa ausgeglichen ist es dagegen bei Tomate (BROUN und TANKSLEY 1996) und Tabak (LAGERCRANTZ et al. 1993). In der Datenbankuntersuchung von MORGANTE und OLIVIERI (1993) fanden sich keine Dinukleotid-Motive in codierenden Bereichen des Genoms. Das (GA)_n-Motiv war hauptsächlich in Introns und den 3'-untranslatierten Bereichen vertreten. Es wurde nur ein (GT)_n-Motiv in einem Intron gefunden. Man kann also davon ausgehen, daß Dinukleotid-Mikrosatelliten fast ausschließlich in nichtcodierenden Bereichen vorkommen.

Ganz anders sind die Häufigkeiten der verschiedenen Dinukleotid-Motive bei Säugetieren. Dort sind Mikrosatelliten etwa fünfmal häufiger als in Pflanzengenomen (LAGERCRANTZ et al. 1993). Bei Säugern ist das GT-Motiv das mit Abstand häufigste (MOORE et al. 1991). Es ist fast doppelt so häufig wie das GA-Motiv und viermal häufiger als (AT)_n. Dagegen kommt letzteres in den Pflanzengenomen mit der größten Frequenz vor (MORGANTE und OLIVIERI 1993), kann aber wegen der Selbstkomplementarität des Motivs bei der praktischen Mikrosatellitenisolierung nur schwer eingesetzt werden (RAFALSKI et al. 1996, LAGERCRANTZ et al. 1993). Hybridisierungsmethoden für dieses Motiv wurden von ERMAK et al. (1990) bei Gerste dargestellt.

Das einzige in dieser Arbeit gefundene Trinukleotid-Motiv war (TGA)_n. Mit den Motiven (CCG)_n und (AGA)_n wurde zwar hybridisiert, es konnten aber keine bzw. nur eine Mikrosatellitensequenz isoliert werden. Lediglich ein (AGA)_n- Mikrosatellit wurde zusammengesetzt mit einem (TGA)_n-Motiv isoliert. Insgesamt ergibt sich eine Abschätzung der Häufigkeit von Trinukleotid-Mikrosatelliten alle 527 kb und damit 1440 dieser Motive im Genom. Es wird hier angenommen, daß sich unter den positiven Phagenklonen auch das Motiv (CCG)_n befand.

Es wurde wahrscheinlich keine Mikrosatellitensequenz mit diesem Motiv isoliert, weil es durch den hohen GC-Gehalt der Klone zu Abbrüchen der Sequenzierreaktion gekommen ist. Dadurch würden sich auch die vielen Ausfälle bei den Sequenzierreaktionen erklären.

Das erklärt aber nicht, daß nur ein $(AGA)_n$ -Motiv gefunden wurde. Letzteres deutet darauf hin, daß dieses Motiv nur in einer sehr geringen Frequenz im Genom von *Beta vulgaris* vorkommt. Ebenfalls keine positiven Klone für dieses Motiv fanden SUN et al. (1998) in einer Phagenbank von *Elymus*. Dies deckt sich nicht mit den Aussagen von MORGANTE und OLIVIERI (1993), wonach das $(AGA)_n$ -Motiv nach $(ATA)_n$ das zweithäufigste Trinukleotid-Motiv in Pflanzengenomen ist.

Das $(CCG)_n$ -Motiv trat in der Datenbankrecherche von MORGANTE und OLIVIERI (1993) mit einer Frequenz von 5% bezogen auf alle Trinukleotid-Motive auf. Dagegen war es bei Datenbankrecherchen für Mais (CHIN et al. 1996) mit 30% und für Reis (AKAGI et al. 1996) mit 45% der Trinukleotid-Motive vertreten. In diesen Untersuchungen kam es sogar in einer höheren Frequenz als das $(ATA)_n$ -Motiv vor.

Wiederum in der Untersuchung von MORGANTE und OLIVIERI (1993) war das $(TGA)_n$ -Motiv nicht unter den zehn häufigsten Trinukleotid-Motiven vertreten. Dagegen fanden DEPEIGES et al. (1995) das $(TGA)_n$ -Motiv als zweithäufigstes nach $(AGA)_n$ in der *Arabidopsis*-Datenbank. Eine Abschätzung der Frequenz des $(TGA)_n$ -Motivs in der vorliegenden Arbeit, ist aufgrund der Probleme mit dem $(CCG)_n$ -Motiv nicht sicher möglich.

Bei MORGANTE und OLIVIERI (1993) zeigte sich, wie vom genetischen Code erwartet, daß im Gegensatz zu den Dinukleotid-Motiven die Trinukleotid-Motive häufig (30%) in codierenden Sequenzen vorkommen. Die anderen 70% fanden sich meist im 5'-flankierendem Bereich oder in Introns. In Datenbanksequenzen des Menschen fanden EDWARDS et al. (1991) nur Trinukleotid-Motive in codierenden Sequenzen, aber keine Tetranukleotid-Motive.

Im Vergleich von positiven Dinukleotid- und Trinukleotid-Motiv Phagenklonen zeigte sich, daß die Dinukleotid-Motive fast zweieinhalbmal häufiger im Genom vorkommen als die Trinukleotid-Motive. MA et al. (1996) fanden in einer Phagenbank von Weizen im Vergleich zu $(GA)_n$ und $(GT)_n$ um eine Zehnerpotenz niedrigere Frequenzen für die Trinukleotid-Motive $(AGA)_n$ und $(TGT)_n$. Dagegen fanden BROUN und TANKSLEY (1996) in ihrer genomischen Bank von Tomate die Motive $(ATA)_n$ und $(CGC)_n$ in fast der gleichen Häufigkeit wie die Dinukleotid-Motive.

Nach MORGANTE und OLIVIERI (1993) ist (TA)_n das häufigste Dinukleotid-Motiv und (ATA)_n das häufigste Trinukleotid-Motiv in Pflanzengenomen. Dies wird in der vorliegenden Arbeit dadurch bestätigt, daß zufällig zwei Marker mit diesen Motiven gefunden wurden. Außerdem sind die Hälfte der zusammengesetzten Dinukleotid-Motiv-Marker mit (TA)_n und 2/3 der Trinukleotid-Motiv Marker mit (ATA)_n verbunden. Ebenfalls einen hohen Anteil von mit dem (TA)_n-Motiv zusammengesetzten Dinukleotid-Mikrosatelliten fanden CHASE et al. (1996) in *Pithecellobium elegans*.

Weitere Methoden zur Ermittlung der Abundanzen und Verteilungen verschiedener Mikrosatelliten in Genomen sind DNA-Fingerprints und *in-situ*-Hybridisierung.

Bei den DNA Fingerprints wird genomische DNA mit einem Restriktionsenzym verdaut und dann durch eine Southern-Hybridisierung mit den Mikrosatellitenmotiven hybridisiert. Anhand der Signalintensität und -verteilung kann auf das Vorkommen und die Verteilung der verschiedenen Motive geschlossen werden. In einer Untersuchung bei Zuckerrübe von SCHMIDT et al. (1993) ergab das Motiv (GTG)₅ zum Beispiel einen sehr kräftigen Schmier. Daraus wurde auf eine hohe Abundanz und eine gleichmäßige Verteilung geschlossen. Diese hohe Abundanz konnten sowohl MÖRCHEN et al. (1996) als auch GROBEN (1998) nicht bestätigen.

Die *in-situ*-Hybridisierung bietet als einzige Methode die Möglichkeit, die genauere Verteilung der Mikrosatelliten im Genom zu untersuchen. Dabei muß jedoch beachtet werden, daß die *in situ* entstehenden Hybridisierungsmuster auch durch größere repetitive Elemente und sehr große Mikrosatelliten entstehen können. Diese sind für die Markerentwicklung jedoch ohne Bedeutung. Bei *in-situ*-Hybridisierungen auf Zuckerrübenchromosomen von SCHMIDT und HESLOP-HARRISON (1996a) zeigten die Motive (AT)_n, (GA)_n und (GGAT)_n eine relativ gleichmäßige Verteilung über die Chromosomen. Dagegen waren die Motive (GT)_n, (GATA)_n und (CAC)_n in der Zentromerregion stärker geklustert.

4.1.3 Effizienz der Markerentwicklung

Eine effiziente Markerentwicklung ist, wie oben bereits angesprochen, aus Kosten und Zeitgründen wichtig. Unter diesem Aspekt soll die hier angewendete Methodik mit anderen Untersuchungen verglichen werden.

In 55% (187 von 339) der positiven Dinukleotid-Motiv-Plasmidklone wurde durch Sequenzieren eine Mikrosatellitensequenz gefunden. Bei den Trinukleotid-Motiv-Klonen war das in 31% (30 aus 96) der Fall. Die Klone, bei denen kein Mikrosatellit gefunden wurde, sind entweder falsch positiv, oder der Mikrosatellit liegt genau in der Mitte der Insertion und diese ist so groß, daß der Mikrosatellit durch eine Sequenzierreaktion von jeder Seite nicht erreicht wurde. Die Ausbeute war innerhalb der Trinukleotid-Motive wesentlich geringer als bei den Dinukleotid-Motiven. Bei vielen Trinukleotid-Klonen war eine Sequenzierung nicht erfolgreich. Dies könnte, wie bereits angesprochen, an dem (CCG)_n-Motiv liegen. Da es sich bei solchen Mikrosatelliten um GC-reiche Regionen handelt kann es zu Störungen in der Sequenzierreaktion kommen.

Bei gleichen Isolierungsmethoden hatten RÖDER et al. (1998) bei Weizen in 64% der Klone Mikrosatellitensequenzen erhalten. Es ist deshalb zu fragen, ob die bei der Zuckerrübe angestrebte und erhaltene durchschnittliche Insertionsgröße der genomischen Banken von 900 bp wirklich optimal ist. Im Fall von kleineren Insertionen würde der Anteil der Klone, bei denen der Mikrosatellit durch die Sequenzierreaktion nicht erreicht wird, verringert. Gleichzeitig besteht dann jedoch die Gefahr, daß die Klone zu klein werden und sich der Anteil der Mikrosatelliten, die zu nah an der Klonierungsstelle liegen, erhöht (RAFALSKI et al. 1996). Außerdem müßten mehr Klone gesichtet werden, um den gleichen Genomanteil zu erfassen.

Um die Anzahl an Sequenzierreaktionen möglichst gering zu halten, wurde von PANAUD et al. (1996), BRYAN et al. (1997) und HUANG et al. (1998) eine PCR-Vorsichtung der positiven Klone durchgeführt. Für jedes Motiv sind fünf PCR-Reaktionen je Klon und Motiv notwendig. Zwei der dabei verwendeten Primer sitzen jeweils links und rechts von der Insertion auf dem Vektor. Die anderen beiden Primer bestehen jeweils aus dem komplementären Mikrosatellitenmotiv am 3'-Ende und einer Ankersequenz am 5'-Ende. Durch diese Vorsichtung läßt sich die Position des Mikrosatelliten in der Insertion genau bestimmen. Somit können Klone ohne Mikrosatelliten, mit einem zu weit entfernten oder zu nah an der Klonierungsstelle liegendem Mikrosatelliten oder einem zu kurzen oder zu langen Mikrosatelliten ausselektiert werden.

In dieser Arbeit mußten die zu langen, zu kurzen und die zu nah an der Klonierungsstelle liegenden Mikrosatelliten nach der Sequenzierung ausselektiert werden. Als zu kurz wurden Mikrosatelliten angesehen, wenn sie weniger als zehn Wiederholungseinheiten aufwiesen. Untersuchungen beim Menschen (WEBER 1990) haben gezeigt, daß Dinukleotid-Mikrosatelliten mit zehn oder weniger Wiederholungseinheiten keinen oder nur einen sehr geringen Polymorphiegrad aufweisen.

Der Anteil der Mikrosatelliten, die zu nah an der Klonierungsstelle liegen ist bei den Trinukleotid-Motiven (27%) wesentlich höher als bei den Dinukleotid-Motiven (11%). Dies kann darauf zurückgeführt werden, daß das (TGA)_n-Motiv der Schnittstellensequenz (GATC) der hier verwendeten Enzyme *Sau3A* und *MboI* ähnlich ist. Dadurch ist die Wahrscheinlichkeit höher, daß sich eine Schnittstellensequenz direkt neben oder in dem Mikrosatelliten befindet.

Es wurden bei den Dinukleotid-Mikrosatelliten 29 (16%) Duplikate gefunden. Duplikate bedeutet hier, die flankierenden Sequenzen der Mikrosatelliten zeigten Homologien größer 90% zueinander. Ob es sich hierbei wirklich um Duplikate oder um längere DNA-Elemente, die in großer Kopienzahl im Genom vorkommen, handelt kann nicht sicher gesagt werden. Der Homologiegrad der Duplikate schwankte zwischen 90% und 100%. In einem größeren Projekt zur Isolierung von Reismikrosatelliten wurden die isolierten (GA)_n-Klone ebenfalls auf Redundanzen geprüft (CHEN et al. 1997). Dabei fanden sich in einer mit dem Restriktionsenzym *Tsp509* hergestellten Bank 20% Duplikate. Dagegen waren es in einer Bank aus gescherten Fragmenten nur 7%.

Durch das kleine Genom von Reis und auch von Zuckerrübe und die relativ geringen Abundanzen der Mikrosatelliten ist die absolute Anzahl nur relativ begrenzt. Im Vergleich zur Zuckerrübe enthält das Weizengenom etwa das zwanzigfache an (GA)_n- oder (GT)_n-Mikrosatelliten (RÖDER et al. 1995). Bei der Isolierung der Reismikrosatelliten und wahrscheinlich auch bei den hier dargestellten Zuckerrübenmikrosatelliten kam es durch die Nutzung nur eines Restriktionsenzym und die Größenselektion der Fragmente zu einer Selektion bestimmter Genombereiche. Um also die Wahrscheinlichkeit der doppelten Isolierung von Mikrosatelliten zu vermeiden, sollten grundsätzlich die genomischen Banken mit verschiedenen Restriktionsenzymen oder gescherten DNA-Fragmenten hergestellt werden (RAFALSKI et al. 1996). Diese Aussage gilt um so mehr, je kleiner das vorliegende Pflanzengenom ist bzw. wenn die Mikrosatellitenabundanzen relativ gering sind. In Banken aus gescherten DNA-Fragmenten tritt jedoch das Problem auf, daß chimäre Klone nicht erkannt werden können. Außerdem zeigen Erfahrungen, daß DNA häufig in Mikrosatellitensequenzen geschert wird (M. GANAL, pers. Mitteilung).

Es wurden 21 (GT)_n-Klone isoliert, die homolog zu der Satelliten DNA "*BamHI*" (SCHMIDT et al. 1991) waren. Um Mikrosatelliten als PCR-Marker nutzen zu können, müssen die flankierenden Sequenzen spezifisch für einen Locus sein. Da dies bei der Satelliten-DNA nicht der Fall ist, können diese Sequenzen nicht zur Markerentwicklung genutzt werden. Bei MÖRCHEN et al. (1996) und GROBEN (1998) waren jeweils 70% bzw. 90% der isolierten (GT)_n-

Mikrosatelliten homolog zu der Satelliten DNA. Dagegen waren es in dieser Arbeit nur etwa 23%. Ein Grund dafür könnte sein, daß sich in der Satelliten-DNA drei Schnittstellensequenzen für die hier verwendeten Enzyme befinden. Davon befindet sich eine Schnittstelle am Anfang der Sequenz, eine an Basenposition 231 und die dritte am Ende an Position 308. Dadurch wurden die Satellitensequenzen in Fragmente kleiner als 300 bp zerschnitten. Durch die Größenselektion der Fragmente von 500 bis 1000 bp, die bei den meisten Banken durchgeführt wurde, wurden diese Fragmente größtenteils nicht kloniert. Dagegen enthält die Sequenz der Satelliten-DNA keine Schnittstellen für die Enzyme, die von MÖRCHEN et al. (1996) und GROBEN (1998) verwendet wurden.

Um die Isolierung dieser Satelliten-DNA vollständig zu vermeiden, wäre bei der Isolierung eine zusätzlich Hybridisierung der positiven Klone mit der betreffenden Sequenz möglich. Dadurch könnten die homologen Klone ausselektiert werden.

Für 85 Dinukleotid- und 17 Trinukleotid-Marker konnten Primer in den flankierenden Sequenzen gesetzt werden. Die Primerpaare wurden an der Linie ZR9-01, aus der die Banken erstellt wurden, getestet. Dabei ergaben 72% der Dinukleotid- und 59% der Trinukleotid-Marker das erwartete Fragment. Die anderen Marker amplifizierten entweder kein Produkt oder sie ergaben einen unspezifischen Schmier. Die Ausbeute an funktionalen Markern war bei den Dinukleotid-Motiven höher. Beim Weizen war der Anteil funktionaler Marker mit 32 bis 67% (RÖDER et al. 1998, MA et al. 1996) wesentlich geringer. Eine Effizienz von 67% konnte bei RÖDER et al. (1998) erst durch einen *Pst*I-Vorverdau bei der Erstellung der genomischen Bank erreicht werden. Ebenfalls sehr geringe Ausbeuten an funktionalen Markern ergaben sich bei *Arabidopsis thaliana* (28%) (DEPEIGES et al. 1995) und Reis (31%) (AKAGI et al. 1996, PANAUD et al. 1996). LIU et al. (1996) benutzten ein "touchdown" PCR-Profil und optimierten die PCR Bedingungen (Primersequenz, Anlagerungstemperatur und MgCl₂-Konzentration) für jeden Marker soweit, daß diese gut funktionierten. WU und TANKSLEY (1993) stellten fest, daß 24 Basen lange Primer eine spezifischere Amplifikation als 20-22 Basen lange Primer ergeben. Eine Optimierung der PCR-Bedingungen für jeden Marker wurde hier nicht vorgenommen. Die Marker sollen unter Standardbedingungen in der Routine eingesetzt werden. Dabei ist ein spezifisches PCR-Protokoll für jeden einzelnen Marker unpraktikabel. Im Vergleich zeigt sich bei den Ergebnissen der Zuckerrübe eine sehr hohe Ausbeute an funktionalen Markern. Ein Grund dafür könnte die vorherige Selektion gegen Duplikate sein. Wenn man annimmt, daß es sich dabei teilweise auch um "multicopy" DNA-Elemente handelt, wurden hierbei Marker ausselektiert, die später

vermutlich eine unspezifische Amplifikation gezeigt hätten. Außerdem ist durch das vergleichsweise kleine Genom der Zuckerrübe der Anteil an "single copy" DNA höher, so daß wahrscheinlich der Anteil an spezifischen Sequenzen, die isoliert wurden, größer ist.

4.2 Charakterisierung

Die Charakterisierung von Mikrosatelliten kann aus unterschiedlichen Gründen von Interesse sein. Unterschiede in Struktur und Größe sowohl zwischen Pflanzenarten als auch zum Tierreich und zum Menschen sind von Interesse. Durch diese Unterschiede läßt sich eventuell auf die Funktion und Entstehung der Mikrosatelliten schließen, über die man zur Zeit noch wenig weiß. Außerdem gibt es durch einige Untersuchungen im Tier- und Pflanzenreich Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Struktur, Größe und dem Polymorphiegrad der Mikrosatelliten.

Nach der Definition von WEBER (1990) lassen sich Mikrosatelliten in einfache perfekte, einfache imperfekte, zusammengesetzte perfekte und zusammengesetzte imperfekte einteilen. Bei den funktionalen Zuckerrübenmikrosatelliten waren 65% der Dinukleotid-Motiv Marker und 80% der Trinukleotid-Motiv Marker imperfekt. Zusammengesetzt waren 42 bzw. 60% der Marker. Auch MÖRCHEN et al. (1996) fanden ähnlich Prozentsätze an imperfekten Dinukleotid-Mikrosatelliten. Dort waren 45% Dinukleotid- und 55% Trinukleotid-Motive imperfekt. Die Dinukleotid-Motive waren allerdings nur zu 27% und die Trinukleotid-Motive zu 22% zusammengesetzt. Im Menschen- und Mausgenom beträgt der Anteil zusammengesetzter Mikrosatelliten etwa 10% WEBER (1990).

Die meisten $(GA)_n$ -Mikrosatelliten sind einfach (60%). Von den einfachen wiederum ist der größte Teil imperfekt. Der hohe Anteil an einfachen $(GA)_n$ -Mikrosatelliten wurde bereits in vielen anderen Pflanzenarten beobachtet (MA et al. 1996, BELL und ECKER 1994, MORGANTE und OLIVERI 1993).

Beim $(GT)_n$ -Motiv sind dagegen die Hälfte (52%) der Mikrosatelliten zusammengesetzt und imperfekt. Auch hier wird die häufig zusammengesetzte Struktur durch viel andere Untersuchungen bestätigt (MA et al. 1996, BELL und ECKER 1994, CONDIT und HUBBELL 1991, ESTOUP et al. 1993, WEBER und MAY 1989). Ein hohen Anteil an imperfekten $(GT)_n$ -Mikrosatelliten fanden auch TARAMINO und TINGEY (1996) bei Mais.

Das (TGA)_n-Motiv kommt bis auf einen Marker immer in zusammengesetztem Zustand vor. Davon sind wiederum die meisten imperfekt. Bei MA et al. (1996) waren bei Weizen ebenfalls nur etwa 30% der Trinukleotid-Motiv Marker einfach und perfekt. Dagegen waren bei Mais (TARAMINO und TINGEY 1996) alle einfach und perfekt. Ein Grund für den hohen Anteil imperfekter (TGA)_n-Mikrosatelliten könnte die geringere Hybridisierungsstringenz bei der Isolierung gewesen sein.

Insgesamt stimmen die hier gemachten Beobachtungen über die Struktur von Zuckerrübenmikrosatelliten mit denen aus anderen Pflanzenarten überein.

Für die Zuckerrübe wurden in dieser Arbeit sehr lange Mikrosatelliten, mit bis zu 103 Wiederholungseinheiten, isoliert. MA et al. (1996) und RÖDER et al. (1995) fanden beim Weizen Dinukleotid-Mikrosatelliten mit maximal 36 bzw. 40 Wiederholungseinheiten. Dies entspricht der hier gefundenen durchschnittlichen Anzahl an Wiederholungseinheiten.

Die (TGA)_n-Motive sind dabei als einfache Mikrosatelliten im Durchschnitt etwas kürzer als die Dinukleotid-Motive. Im zusammengesetztem Zustand ist es genau umgekehrt. Dadurch, daß das (TGA)_n-Motiv dann immer mit sehr vielen Wiederholungseinheiten des (ATA)_n-Motivs verbunden ist, ergeben sich sehr lange Mikrosatelliten. Innerhalb der Dinukleotid-Motive sind die (GA)_n-Mikrosatelliten in einfachen Zustand im Durchschnitt die längsten. Dadurch, daß die (GT)_n-Mikrosatelliten häufig mit sehr langen (AT)_n-Motiven verbunden sind, ergeben sie in der Klasse der zusammengesetzten Mikrosatelliten im Durchschnitt die meisten Wiederholungseinheiten.

Allgemein kann gesagt werden, daß die vergleichsweise hohe Anzahl an Wiederholungseinheiten der hier isolierten Mikrosatelliten aus den zusammengesetzten, häufig mit (AT)_n und (ATA)_n kombinierten, und damit sehr langen Mikrosatelliten resultiert. MORGANTE und OLIVERI (1993) fanden bei Pflanzen in Datenbanksequenzen im Durchschnitt längere (TA)_n- als (GA)_n-Mikrosatelliten. Unter den hier isolierten Sequenzen befinden sich aber auch kurze einfache Mikrosatelliten. Diese haben nur eine durchschnittliche Anzahl von 15 und 24 Wiederholungseinheiten. Für die Markerentwicklung ist diese Länge gut geeignet. Damit waren die hier gewählten Stringenzen bei der Hybridisierung optimal gewählt.

4.3 Polymorphiegrad

Das wohl wichtigste Kriterium für die Qualität eines Markers ist dessen Polymorphiegrad. Dabei kann man zum einen die hier entwickelten Mikrosatelliten untereinander als auch mit anderen Markertypen vergleichen.

Zum anderen können die hier detektierten Polymorphismen mit denen in anderen Pflanzenarten verglichen werden. Dabei spielt natürlich eine Rolle, inwieweit die dafür herangezogenen Genotypenstichproben die entsprechende Gattung oder Spezies repräsentieren.

Als Kriterien für den Polymorphiegrad werden hier die Anzahl auftretender Allele und der PIC-Wert betrachtet. Erstmals genutzt wurde der PIC-Wert eines Markers in der Humangenetik von BOTSTEIN et al. (1980). Hier wurde der PIC-Wert nach einer vereinfachten Formel von ANDERSON et al. (1993) berechnet.

Von den funktionalen Dinukleotid-Motiv-Markern waren 11% monomorph, das heißt sie amplifizierten in allen 23 Genotypen ein Fragment gleicher Größe. Bei den Trinukleotid-Motiv Markern zeigten alle funktionalen Marker Polymorphismus. Damit ist der hier gefundene Anteil polymorpher Marker größer als bei GROBEN (1998), bei dem 64% der Marker Polymorphismus zeigten. Einen Anteil von 12% monomorpher Dinukleotid-Marker publizierten auch BRYAN et al. (1997) beim Weizen. Getestet wurden dort 49 Marker an zehn Genotypen. Dagegen waren in 20 Apfelsorten alle 17 Mikrosatelliten polymorph (GIANFRANCESCHI et al. 1998). Beim Test von neun Dinukleotid- und einem (ATA)_n-Mikrosatelliten an zehn Tomatengenotypen waren bei BROUN und TANKSLEY (1996) nur der (ATA)_n- und ein (GA)_n-Mikrosatellit polymorph. In der Untersuchung von ARESHCHENKOVA und GANAL (1999), ebenfalls bei Tomate, waren jedoch nur zwei von 20 Mikrosatellitenmarkern monomorph.

Bei der Betrachtung der polymorphen Marker zeigt sich bei der durchschnittlichen Anzahl von Allelen je Marker kein Unterschied zwischen den Dinukleotid- und Trinukleotid-Mikrosatelliten. Die Anzahl von Allelen variierte zwischen 2 und 13 und betrug im Durchschnitt 4,9. Die hier eingesetzten Genotypen repräsentieren das in der Züchtung der KWS Saat AG eingesetzte genetische Material. Es sind keine Wildformen in dem Sortiment vorhanden. Ausnahme ist die Linie ZR9-22, die einen Genomanteil von etwa 30% der Subspezies *B. maritima* trägt.

Ähnliche Werte finden sich bei *Arabidopsis thaliana* mit durchschnittlich 4,1 Allelen bei 33 Markern und sechs Genotypen (BELL und ECKER 1994) und *Brassica* mit 5,3 Allelen bei vier Markern in drei Spezies (LAGERCRANTZ et al. 1993). Die Ergebnisse sind nur eingeschränkt vergleichbar, da es sich bei *Arabidopsis* um kein züchterisch eingeschränktes Material handelt und bei *Brassica* mit den Spezies *B. napus*, *B. rapa*, *B. oleracea* und *B. nigra* ein sehr breites Spektrum an Genotypen untersucht wurde. Geringer war die durchschnittliche Anzahl Allele mit 2,7 bei elf Gerstengenotypen und zehn Mikrosatelliten (BECKER und HEUN 1995) und Mais mit 3,5 bei acht Genotypen und sechs Markern (SENIOR und HEUN 1993). Bei der Gerstenuntersuchung handelte es sich bei den untersuchten Genotypen um kommerzielle Sorten, die den gesamten Bereich der Gerstenzüchtung abdecken. Höher war die durchschnittliche Anzahl Allele mit 7,0 bei drei Sojabohnenmikrosatelliten in 43 Genotypen (AKKAYA et al. 1992) und beim Weizen mit 6,2 in 20 Sorten und 23 Markern (PLASCHKE et al. 1995). Diese beiden Untersuchungen sind sehr gut mit den Ergebnissen dieser Arbeit vergleichbar. Bei der Sojabohne handelt es sich um eine Auswahl aus dem nordamerikanischen Zuchtmaterial und fünf Wildgenotypen (*Glycine soja*). Die Weizenuntersuchung beinhaltete europäische und deutsche Sorten. Außerdem wurden zwei chinesische Sorten und *Triticum aethiopicum* aus Äthiopien mit untersucht. Einen Überblick über die zitierten Untersuchungen gibt Tabelle 4.1.

Tab. 4.1: Referenzen zum Polymorphiegrad von Mikrosatellitenmarkern in verschiedenen Pflanzenarten und mit verschiedenen Mikrosatellitenmotiven, mit den Anzahlen untersuchter Genotypen und Marker und dem Mittelwert (\bar{x}) der detektierter Allele je Marker

| Referenz | Pflanzenart | Motive | Anzahl | | |
|-------------------------|--------------------|--|-----------|--------|---------------------|
| | | | Genotypen | Marker | \bar{x} Allele |
| AKKAYA et al. 1992 | Sojabohne | (TA) _n , (GT) _n , (TAA) _n | 43 | 3 | 7,0 |
| BELL und Ecker 1994 | <i>A. thaliana</i> | (GA) _n , (TA) _n , (A) _n | 6 | 33 | 4,1 |
| BECKER und HEUN 1995 | Gerste | (TA) _n , (GT) _n , div. | 11 | 10 | 2,7 |
| LAGERCRANTZ et al. 1993 | <i>Brassica</i> | (GA) _n , (GT) _n | 3 | 4 | 5,3 |
| PLASCHKE et al. 1995 | Weizen | (GA) _n , (GT) _n | 20 | 23 | 6,2 |
| SENIOR und HEUN 1993 | Mais | (GA) _n | 8 | 6 | 3,5 |

Bei sieben Zuckerrübenmikrosatelliten mit Dinukleotid-Motiven traten in der vorliegenden Studie bei 1 bis 15 Genotypen sogenannte Nullallele auf. Diese Nullallele können durch Punktmutationen, Deletionen oder Insertionen an einer der Primerbindungsstellen entstehen (DEVOS et al. 1995). Da es sich bei dem hier untersuchten Zuckerrübenlinien um frühe Inzuchtgenerationen handelt, ist die Frequenz der Nullallele wahrscheinlich noch unterschätzt, weil diese nur in homozygotem Zustand detektiert werden können. Einen sehr hohen Anteil von 72% Markern mit Nullallelen hatten GIANFRANCESCHI et al. (1998) bei verschiedenen Apfelsorten. Beim Mais (TARAMINO und TINGEY 1996) traten in 5% der Genotypen Nullallele auf. Beim Weizen zeigten drei von 23 Mikrosatelliten (PLASCHKE et al. 1995) in einigen Genotypen Nullallele. Einen Einfluß auf das Auftreten von Nullallelen könnte die Auswahl des Genotyps, aus dem die Mikrosatelliten isoliert wurden, haben. Dabei sollte dieser Genotyp eine enge Verwandtschaft zu dem genetischen Material zeigen, in dem die Marker später hauptsächlich eingesetzt werden. Dadurch ist die Wahrscheinlichkeit, daß es Unterschiede in den flankierenden Sequenzen gibt, am geringsten.

Es konnte bei den Zuckerrübenmikrosatelliten kein Zusammenhang zwischen dem Polymorphiegrad und der Anzahl der Wiederholungseinheiten eines Mikrosatelliten, dem Mikrosatellitenmotiv oder dessen Struktur festgestellt werden.

Beim Menschen konnte WEBER (1990) zeigen, daß bei weniger als 10-12 Wiederholungseinheiten der Polymorphismus sehr gering ist. Eine ähnliche Tendenz zeigte sich auch bei Reis (WU und TANKSLEY 1993). Außerdem ergab sich bei Tomate (SMULDERS et al. 1997) ab 12 Wiederholungseinheiten eine positive Beziehung zwischen der Anzahl der Wiederholungseinheiten und dem Polymorphiegrad. PLASCHKE et al. (1995) und BRYAN et al. (1997) fanden bei Weizenmikrosatelliten zwischen dem Polymorphiegrad und der Anzahl an Wiederholungseinheiten eine Korrelation von 0,55 ($P < 0,05$) und 0,61 ($P < 0,001$). Keine eindeutige Beziehung zwischen diesen beiden Faktoren fanden BELL und ECKER (1994) bei *Arabidopsis thaliana*. Außer bei WEBER (1990) wurde jedoch in allen Untersuchungen eine kritische Grenze für die minimale Größe eines Mikrosatelliten festgelegt. Diese lag in der Regel bei 10-12 Wiederholungseinheiten. Daraus ist zu schließen, daß unter zehn Wiederholungseinheiten der Polymorphiegrad geringer ist. Da in der vorliegenden Arbeit nur drei Zuckerrübenmikrosatelliten mit weniger als zehn Wiederholungseinheiten analysiert wurden, ist diese kritische Grenze nicht zu erkennen.

Einen Zusammenhang zwischen Polymorphismus und dem Mikrosatellitenmotiv fanden BELL und ECKER (1994). In ihrer Untersuchung bei *Arabidopsis thaliana* war von 18 (GT)_n-Mikrosatellitenmarkern nur einer polymorph. Dagegen waren es beim (GA)_n-Motiv 25 von 37. Gleichzeitig zeigten die meisten (GT)_n-Mikrosatelliten eine zusammengesetzte Struktur und waren schwer zu amplifizieren. Die (GA)_n-Mikrosatelliten waren alle einfach. Keinen Effekt des Motives auf den Polymorphiegrad konnten BRYAN et al. (1997) bei Weizenmikrosatelliten feststellen.

Imperfekte Mikrosatelliten sind beim Menschen weniger polymorph als perfekte (WEBER 1990). Die gleiche Beobachtung machten auch TARAMINO und TINGEY (1996) beim Mais.

Allgemeine Aussagen können über diese Zusammenhänge wohl nicht gemacht werden. Dazu muß jede Pflanzenart einzeln betrachtet werden. Bei den einzelnen Pflanzenarten sind jedoch meist nicht genug Mikrosatellitenmarker publiziert und untersucht, um eine endgültige Aussage treffen zu können.

Für den PIC-Wert konnten hier keine Unterschiede zwischen Dinukleotid- und Trinukleotid-Mikrosatellitenmarkern festgestellt werden. Zum gleichen Ergebnis kamen BRYAN et al. (1997) bei Weizen und TARAMINO und TINGEY (1996) bei Mais.

Im Durchschnitt zeigten die polymorphen Zuckerrübenmikrosatellitenmarkern in der vorliegenden Untersuchung einen PIC-Wert von 0,58 (0,17-0,86). Fast die gleichen Werte erhielt GROBEN (1998) ebenfalls bei Zuckerrübe.

Hoch waren die PIC-Werte mit durchschnittlich 0,87 bei der Sojabohne (RONGWEN et al. 1995). Die durchschnittlichen Werte betragen bei Apfel 0,78 (GIANFRANCESCHI et al. 1998) und bei Mais 0,76 (TARAMINO und TINGEY 1996). Beim Reis ergaben sich PIC-Werte im Mittel von 0,69 (PANAUD et al. 1996) und beim Weizen 0,63 (RÖDER et al. 1995). Diese Untersuchungen zeigen, daß die PIC-Werte bei der Zuckerrübe vergleichsweise gering sind. Dabei muß jedoch beachtet werden, daß diese Maßzahl extrem vom untersuchten Pflanzenmaterial abhängig ist. Zum einen wurde hier nur Zuchtmaterial einer Firma untersucht. Außerdem besteht eine sehr enge genetische Basis, auf der sich das allgemeine Züchtungsmaterial bei der Zuckerrübe aufbaut. Dadurch wären diese geringen PIC-Werte zu erklären. In der vorliegenden Untersuchung wurden ja keine Genotypen anderer Subspezies mit einbezogen.

Die Clusteranalyse zeigt eine sehr gute Differenzierung zwischen den untersuchten Linien. Durch den hohen Polymorphiegrad der Mikrosatellitenmarker ist die genetische Ähnlichkeit zwischen

den Genotypen gering. Sie beträgt im Durchschnitt 0,27. Es werden klar die genetischen Beziehungen zwischen den Linien aufgezeigt. Die Linie ZR9-22 trägt einen Genomanteil von 20-30% der Subspezies *B. maritima*. Das wird deutlich bestätigt, da diese Linie ganz außerhalb der anderen Gruppierungen liegt. Die Linie ZR9-L16 wurde aus einer Kreuzung der Linie ZR9-L05 mit einer hier nicht untersuchten Linie entwickelt. Die enge Verwandtschaft zwischen diesen beiden Linien wird durch eine hohe genetische Ähnlichkeit bestätigt. Auch zeigen sich Gruppierungen von multigermen und monogermen Genotypen. Die Linien ZR9-03, -04, -20 und -23 stammen aus nordamerikanischem Zuchtmaterial, das auf öffentliche Stämme des USDA (United States Department of Agriculture) zurückgeht. Auch diese Linien zeigen eine Gruppierung innerhalb des Dendrogramms.

Die Nutzung von Mikrosatelliten zur Charakterisierung und Identifizierung von genetischem Material ist bereits bei vielen verschiedenen Kulturpflanzen dargestellt worden. Einige Beispiele sind in Tabelle 4.2 gegeben.

Tab 4.2: Publikationen über die Nutzung von Mikrosatellitenmarkern zur Charakterisierung und Identifizierung von genetischem Material, mit den Angaben zur Kulturart, der Anzahl untersuchter Genotypen (n G), der Anzahl verwendeter Marker (n M), dem verwendeten Koeffizienten für die genetische Ähnlichkeit (GS) und der mittleren (\bar{x}) GS.

| Referenz | Kulturart | n G | n M | GS-Koeffizient | \bar{x} GS |
|-------------------------|--------------|-----|-----|-----------------|--------------|
| PLASCHKE et al. 1995 | Weizen | 41 | 23 | NEI und LI 1979 | 0,31 |
| DIWAN und CREGAN 1997 | Sojabohne | 36 | 20 | eigener Koeff. | 0,39 |
| RUSSEL et al. 1997b | Gerste | 18 | 13 | NEI und LI 1979 | 0,93-0,45 |
| JARRET et al. 1997 | Wassermelone | 33 | 7 | JACCARD 1908 | 0,49 |
| STRUSS und PLIESKE 1998 | Gerste | 163 | 15 | NEI und LI 1979 | 0,27 |
| RIVERA et al. 1999 | Kokos | 20 | 41 | simple matching | - |

4.4 Markervergleich

Molekulare Marker werden unter anderem zur genetischen Kartierung, zur markergestützten Selektion oder für Fingerprint-Untersuchungen zur Bestimmung der genetischen Diversität genutzt.

Für diese Fragestellungen werden in der Praxis verschiedene molekulare Markertypen eingesetzt. Der erste, bereits in den 80er Jahren stark genutzte Markertyp waren die RFLP-Marker (BOTSTEIN et al. 1980, BECKMANN und SOLLER 1983). Durch diese Methode werden Polymorphismen in Restriktionsschnittstellen oder größere Deletionen und Insertionen detektiert. RFLP-Marker sind codominant und multiallelisch. Große Nachteile sind die radioaktive Detektion und daß eine relativ große Menge an hochqualitativer DNA benötigt wird.

Durch die Einführung der PCR-Technik (polymerase chain reaction) (MULLIS et al. 1986) kamen zunächst Markertypen wie RAPD- (WILLIAMS et al. 1990) und AFLP-Marker (ZABEAU and VOS 1993) hinzu.

RAPD-Polymorphismen resultieren aus Veränderungen an den Bindungsstellen der Primer. Vorteile sind die einfache und universelle Anwendung und die geringe Menge DNA, die benötigt wird. Die dominante Vererbung der RAPD-Fragmente und der hohe Aufwand für eine gute Reproduzierbarkeit sind Nachteile.

In der AFLP-Technik sind die Detektion von Restriktionspolymorphismen, Mutationen in der Primerbindungsstelle und Deletionen oder Insertionen kombiniert. Je nach detektiertem Polymorphismus ist dieser dominant oder codominant. Die Technik zeichnet sich durch einen sehr hohen Multiplex-Faktor (RAFALSKI et al. 1996) aus. In einer Reaktion bzw. Gelspur können selektiv sehr viele informative Fragmente generiert werden. Für die Analyse wird allerdings eine sehr hohe DNA-Qualität benötigt.

Neben den technischen Vor- und Nachteilen steht bei der Wahl des Markertyps der Informationsgehalt für Anwendungen im Vordergrund (RAFALSKI und TINGEY 1993). Dieser resultiert aus dem Polymorphiegrad und dem Multiplex-Faktor. In dieser Arbeit wurden die Markertypen nur im Hinblick auf ihren Polymorphiegrad untersucht. In die vorliegenden Datensätzen gehen daher nur polymorphe Marker bzw. Fragmente ein. Verglichen wurden die hier entwickelten Mikrosatelliten mit RFLP- und AFLP-Markern. Dabei hat sich in den bereits publizierten Untersuchungen an verschiedenen Kulturpflanzenarten gezeigt, daß man keine

allgemeingültige Aussage über die Polymorphiegrade der verschiedenen Markertypen bei Pflanzen machen kann (BOHN et al. 1999, PEJIC et al. 1998, RUSSEL et al. 1997a, POWELL et al. 1996). Um die drei Markertypen für die Zuckerrübe sauber vergleichen zu können wurden mit allen Markern die gleichen Genotypen untersucht. Dies ist notwendig, da der Polymorphiegrad stark von der genetischen Zusammensetzung des untersuchten Materials abhängig ist.

PEJIC et al. (1998) kalkulierten auf der Basis von 33 Maislinien mit dem "bootstrap" Verfahren die Stichprobenvarianzen der genetischen Ähnlichkeiten für die verschiedenen Markertypen. Daraus leiteten sie die Anzahl nötiger Loci für eine zuverlässige Schätzung der genetischen Ähnlichkeiten ab. Dabei ergab sich bei 150 Markern eine Standardabweichung von 0,1. Demnach war die hier gewählte Dimensionierung der Anzahl verwendeter Marker bzw. polymorpher Fragmente richtig gewählt.

Alle drei Markertypen konnten, bis auf eine Ausnahme, zwischen den neun untersuchten Linien differenzieren. Auch ergaben sich bei allen Markertypen Variationen innerhalb der Linien. Die hohen kophänetischen Korrelationen zeigen bei allen Markertypen eine sehr gute Übereinstimmung zwischen den Dendrogrammen und den paarweisen Ähnlichkeitsmaßen. Die Korrelationen zwischen den verschiedenen Markertypen zeigen eine hohe Übereinstimmung zwischen den Dendrogrammen. Gute Übereinstimmungen zwischen Mikrosatelliten-, RFLP- und AFLP-Markern fanden auch POWELL et al. (1996) und PEJIC et al. (1998). Beide Autoren zogen zusätzlich noch RAPD-Marker in die Untersuchung mit ein und fanden deutlich geringere Korrelationen zu diesem Markertyp.

Die genetischen Ähnlichkeiten zwischen den Linien sind bei den Mikrosatellitenmarkern im Mittel am geringsten. Daraus kann geschlossen werden, daß Mikrosatellitenmarker den höchsten Polymorphiegrad besitzen. Dies ist auf den höheren durchschnittlichen Alleliegrad zurückzuführen. Dieses Ergebnis wird in der Literatur mehrfach bestätigt. RUSSEL et al. (1997a) erhielten bei einem Markervergleich an 18 Gerstensorten mit Mikrosatellitenmarkern, im Vergleich zu RFLP-, AFLP- und RAPD-Markern, die geringsten genetischen Ähnlichkeiten. Auch bei Sojabohne fanden POWELL et al. (1996) höhere PIC-Werte bei Mikrosatellitenmarkern im Vergleich zu den beiden anderen Markertypen. Auch stellten WU und TANKSLEY (1993) bei Reis einen signifikant höheren Informationsgehalt von Mikrosatellitenmarkern gegenüber RFLP-Markern fest. Einen doppelt so hohen PIC-Wert bei Mikrosatellitenmarkern im Vergleich zu RFLP-Markern fanden RÖDER et al. (1995) bei der Untersuchung von 18 Weizenlinien. Dagegen

ergaben sich bei der Untersuchung von elf Winterweizensorten von BOHN et al. (1999) keine Unterschiede in den PIC-Werten der verschiedenen Markertypen.

Zwischen RFLP- und AFLP-Markern zeigen sich hier keine wesentlichen Unterschiede. Dagegen fanden PEJIC et al. (1998) und BECKER et al. (1995) einen geringeren Informationsgehalt von AFLP- im Gegensatz zu RFLP-Markern.

Bei den genetischen Ähnlichkeiten innerhalb der Linien zeigen sich in den Durchschnittswerten keine Unterschiede zwischen den Markertypen. Hier zeigt sich keine Überlegenheit der Mikrosatellitenmarker in Bezug auf den Polymorphiegrad.

Dieses Ergebnis wirft die Frage auf, ob bei Markervergleichen eine generelle Aussage über den Polymorphiegrad und die Vergleichbarkeit der Markertypen getroffen werden kann. Bei Untersuchungen mit Genotypen einer breiteren oder engeren genetischen Basis könnten sich andere Ergebnisse ergeben. Verdeutlicht wird dies auch durch die unterschiedlichen Resultate von RÖDER et al. (1995) und BOHN et al. (1999) bei Weizen. Auch fanden POWELL et al. (1996) Unterschiede bei den Verhältnissen der genetischen Ähnlichkeiten und der Korrelationen zwischen den Matrizes. Verglichen wurden hier Dendrogramme interspezifischer Genotypen von *Glycine* mit Dendrogrammen intraspezifischer Genotypen von *G. soja* bzw. *G. max*. Es wurde gezeigt, daß besonders die Korrelationen der Ähnlichkeitsmaße mit den Mikrosatellitenmarkern Unterschiede aufwiesen. Auch im Humanbereich wurden ähnliche Beobachtungen gemacht (BOWCOCK et al. 1994). POWELL et al. (1996) schlußfolgern, daß Mikrosatelliten nur in einem bestimmten Fenster von genetischen Ähnlichkeiten gute Korrelationen zu den anderen Markertypen zeigen.

Der höhere Grad an Polymorphismus der Mikrosatellitenmarker kann auf den Mechanismus, durch den neue Allele entstehen, zurückgeführt werden. Nach TAUTZ et al. (1986) und SCHLÖTTERER und TAUTZ (1992) entstehen neue Mikrosatellitenallele durch das sogenannte "slippage" der Polymerase während der Replikation der DNA. Dabei können theoretisch sehr viele verschiedene Allele an einem Locus entstehen. Vorausgesetzt ist, daß sich der Mikrosatellit nicht im kodierenden Bereich eines Genes befindet. Damit unterscheidet sich der Mechanismus der Allelentstehung bei den Mikrosatellitenmarkern entscheidend von dem bei RFLP- und AFLP-Markern.

Die gleichen genetischen Ähnlichkeiten innerhalb der Linien könnten die Vermutung widerlegen, daß Mikrosatellitenallele nicht stabil über Generationen vererbt werden (MOREL et al. 1998). Zumindest sind sie nicht instabiler als andere Mutationen. Die hier detektierten Variationen sind auf die nicht vollständige Inzucht der Linien zurückzuführen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Mikrosatellitenmarker im Vergleich zu den RFLP- und AFLP-Markern einen höheren Polymorphiegrad aufweisen. Für Fingerprint-Untersuchungen wäre somit eine geringere Anzahl an Mikrosatellitenmarkern notwendig, um eine gute Charakterisierung der Genotypen zu erreichen. Außerdem können prozentual mehr Mikrosatelliten in einer Population genetisch kartiert werden. Die Wahrscheinlichkeit, daß diese zwischen den Eltern polymorph sind, ist höher. Allerdings muß beim Vergleich der Markertypen, in Bezug auf ihren allgemeinen Informationsgehalt, der hohe Multiplex-Faktor der AFLP-Technik mit berücksichtigt werden. Obwohl die Polymorphismen auf einem anderen Mutationsmechanismus beruhen, zeigen sich für die genetischen Ähnlichkeiten, doch hohe Korrelationen zwischen den beiden Markertypen. Dabei ist fraglich, ob sich die gefundenen Polymorphismen und Korrelationen in Untersuchungen mit anderem genetischem Material bestätigen.

4.5 Genomische Verteilung der Mikrosatelliten

Markergestützte Selektion ist eine wichtige Anwendung für molekulare Marker in der Pflanzenzüchtung. Diese Methode basiert auf der Kopplung des interessierenden Merkmals oder "quantitative trait loci" (QTL) mit entsprechenden Markerloci. Aus genetischen Karten können die Markerloci mit einer engen Kopplung zu monogenischen Eigenschaften oder QTLs für die Selektion ausgewählt werden. Damit Markerloci mit einer entsprechend engen Kopplung zu verschiedenen Merkmalen zur Verfügung stehen, sollte die genetische Karte möglichst dicht besetzt sein.

Für die Zuckerrübe wurden bereits verschiedene genetische Kopplungskarten publiziert. Die Karten von WAGNER und WRICKE (1991) und WAGNER et al. (1992) basierten noch auf morphologischen und Isoenzym-Markern. Die ersten, mit RFLP-Markern besetzten, Karten wurden von BARZEN et al. (1992), PILLEN et al. (1992) und PILLEN et al. (1993) erstellt. Später kam die Karte von HALLDÉN et al. (1996) hinzu und die Karte von BARZEN et al. (1992) wurde mit neuen RFLP- und RAPD-Markern verbessert (BARZEN et al. 1995). UPHOFF und WRICKE (1995) erstellten eine Karte aus RAPD-Markern. In die Karte von PILLEN et al. (1993) integrierten SCHONDELMAIER et al. (1996) 120 AFLP-Marker. 1997 wurden die Karteninformationen vom Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung in Köln und vom Institut

für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung in Kiel von SCHUMACHER et al. (1997) gemeinsam verrechnet und eine kombinierte Kopplungskarte mit insgesamt 600 Markern erstellt.

Die beiden hier untersuchten Populationen unterscheiden sich deutlich im Polymorphiegrad. Diese war anhand der Ergebnisse aus Abschnitt 3.5 zu erwarten. Die beiden Eltern der 9502-Population zeigen eine wesentlich engere Verwandtschaft als die Eltern der 9704-Population. Hier wird der Anteil von *Beta vulgaris* ssp. *maritima* in der Abstammung des Elters ZR9-L22 deutlich. Diese Population zeigte einen sehr hohen Polymorphiegrad. Etwa 50% der getesteten Mikrosatellitenmarker waren zwischen den Eltern polymorph. In der 9502-Population waren es nur 25%.

Durch die große Distanz des Elters ZR9-L22 zu dem Genotyp, aus dem die Mikrosatelliten isoliert wurden (ZR9-L01), ergaben sich bei einigen Mikrosatelliten Nullallele. Dadurch konnten die betroffenen Marker nur dominant kartiert werden.

Die Eltern sollten möglichst distant zueinander sein, damit man einen hohen Anteil an Polymorphismus nutzen kann. Dagegen sollten die Eltern nicht zu weit vom Ursprungsgenotyp der Markerentwicklung entfernt sein. Dadurch steigt die Wahrscheinlichkeit, daß es größere Unterschiede in der Sequenzabfolge der flankierenden Sequenzen und damit der Primerbindungsstellen gibt. Ist eine Primerbindungsstelle verändert, so kommt es zu keiner Amplifikation des Mikrosatelliten und damit zu einem Nullallel. Diese Faktoren sind also bei der Auswahl der Kartierungseltern abzuwägen.

Die 33 Mikrosatellitenloci zeigen eine gute Verteilung über die neun Chromosomen. Nur auf Chromosom VIII kartierte kein Mikrosatellit. Auf den Chromosomen IV und VI ergibt sich eine gewisse Häufung der Mikrosatelliten. Es gibt aber keine Marker, die ohne Rekombination zueinander kartieren. Außerdem befinden sich in der Karte von SCHUMACHER et al. (1997) in den betreffenden Bereichen der Chromosomen ebenfalls Häufungen anderer Marker. Hier handelt es sich um Bereiche mit reduzierter Rekombination. Da diese Bereiche in der Mitte der Kopplungsgruppen lokalisiert sind, handelt es sich vermutlich um die Zentromerregionen. Dies ist anzunehmen, da bei Zuckerrübe die Chromosomen meist metazentrisch oder submetazentrisch sind (BOSEMARK und BORMOTOV 1971).

Einige der Marker zeigen eine gestörte Spaltung. Dies tritt besonders bei den Markern der Chromosomen IV und V auf. Alle Marker auf Chromosom V haben einen sehr geringen Anteil in einer Homozygotenklasse. Hier wird vermutet, daß sich auf diesem Chromosom ein Lethalgen befindet, durch das die gestörten Spaltungen hervorgerufen werden (PILLEN et al. 1993, WAGNER et al. 1991, ABE und TSUDA 1988).

Es konnten keine Unterschiede zwischen den Kartierungspositionen der unterschiedlichen Mikrosatellitenmotive festgestellt werden. Dies ist bei einer gleichmäßigen Verteilung im Genom auch nicht zu erwarten. Dagegen stellten SCHMIDT und HESLOP-HARRISON (1996) bei *in-situ*-Hybridisierungen des Mikrosatellitenmotivs $(GT)_n$ eine starke Klusterung in den Zentromerbereichen der Zuckerrübenchromosomen fest. Dies konnte hier nicht bestätigt werden. Die in der *in-situ*-Hybridisierung gefundenen Muster resultieren wahrscheinlich aus größeren repetitiven Elementen. Hierzu gehört auch die bereits erwähnte Satelliten-DNA "BamHI". $(GT)_n$ -Mikrosatelliten, die nicht zu dieser Satelliten-DNA gehören, scheinen gleichmäßig im Genom verteilt zu sein.

Trotzdem kann nicht immer von einer gleichmäßigen Verteilung bestimmter Motive im Genom ausgegangen werden. Bei Tomate zeigt besonders das Motiv $(GATA)_n$, aber auch $(GA)_n$ und $(GT)_n$ eine Klusterung in den Zentromerbereichen (ARESHCHENKOVA und GANAL 1999, BROUN und TANKSLEY 1996).

Bei der Zuckerrübe zeigen Mikrosatellitenmarker einen sehr hohen Polymorphismus. Grundsätzlich scheinen sie gleichmäßig in großer Anzahl über das Genom verteilt zu sein. Dadurch ist es in Zukunft möglich, mit Hilfe von Mikrosatelliten dichte genetische Kopplungskarten zu erstellen.

4.6 Einsatz von Mikrosatellitenmarkern in der Zuckerrübenzüchtung

Die vielen positiven Eigenschaften von Mikrosatellitenmarkern machen sie momentan zu dem Markertyp der Wahl in der Pflanzenzüchtung. Sie kommen häufig und gleichmäßig verteilt im Zuckerrübengenom vor. Ihr hoher Polymorphiegrad und die codominante Vererbung sind Vorteile gegenüber anderen Markertypen.

Mikrosatelliten können potentiell vielfältig in der praktischen Zuckerrübenzüchtung eingesetzt werden. Hierzu gehört zum Beispiel die Überprüfung von Handkreuzungen. Dabei werden die Nachkommenschaften auf die elterlichen Allele überprüft und eventuelle Selbstungen oder Fremdbestäubungen verworfen. Dieser Anwendung kommt eine große Bedeutung zu, da in der Vergangenheit die Selbstfertilität im genetischen Material der Züchtung etabliert wurde. Diese ist zur Erstellung von Inzuchtlinien für die Hybridzüchtung unerlässlich. Bei Handkreuzungen ergibt sich jedoch durch die Selbstfertilität die Möglichkeit der Selbstbestäubung. Die hier entwickelten Mikrosatellitenmarker sind bereits für diese Fragestellung verwendet worden (C. GLASS pers. Mitteilung, K. WEIßLEDER pers. Mitteilung). Für Kreuzungsnachweise ist nur eine begrenzte Anzahl von Mikrosatellitenmarkern notwendig. Es werden jedoch zuerst mehrere Marker mit den Kreuzungseltern vorgetestet. Die danach ausgewählten Marker müssen klar differenzieren, d. h. sie dürfen keine gemeinsamen Allele zwischen den Kreuzungspartnern zeigen.

Für die folgenden Anwendungen ist die Information über die Kartierungsposition der Marker entweder zwingend notwendig oder aber von Vorteil. Da in einer Population immer nur ein gewisser Anteil der Marker kartierbar ist, sind zur vollständigen Kartierung aller Marker mehrere Populationen notwendig. Außerdem können nicht alle Merkmale von Interesse in einer Population berücksichtigt werden. Auch deshalb müssen mehrere Populationen erstellt werden. Aus den genetischen Kopplungskarten der verschiedenen Populationen kann dann eine gemeinsame Karte errechnet werden. Dadurch können alle Marker zusammen mit allen Merkmalen von Interesse in einer Karte betrachtet werden.

Eine wichtige Anwendung ist die Ermittlung genetischer Distanzen im Zuchtmaterial (TARAMINO und TINGEY 1996, PEJIC et al. 1998). Dadurch kann das Material in genetisch distinkte Gruppen eingeteilt werden, was eine wichtige Voraussetzung für die Definition von heterotischen Gruppen in der Hybridzüchtung ist. Hierfür ist eine größere Anzahl an Markern notwendig, da bei der Auswahl der Marker auf eine gleichmäßige Genomabdeckung geachtet werden sollte. Für eine gute Differenzierung waren in der vorliegenden Arbeit 40 bis 50 Mikrosatellitenmarker ausreichend. Generell ist die Anzahl benötigter Mikrosatellitenmarker für diese Anwendung vom Polymorphiegrad der Marker und von der genetischen Basis des zu untersuchenden Materials abhängig.

Die Mikrosatellitenmarker können außerdem bei verschiedenen Arten der markergestützten Selektion bzw. Rückkreuzung eingesetzt werden (RIBAUT et al. 1997). Ist ein Marker mit dem Gen des Donors gekoppelt, so kann mit diesem auf die Eigenschaft selektiert werden. Dies ist besonders von Vorteil, wenn die Ausprägung des Gens, z.B. eine Resistenz, phänotypisch nur sehr schwer oder aufwendig zu evaluieren ist. Vorher, d.h. nach der Kartierung, muß jedoch die Kopplung zwischen Markerlocus und Gen in weiterem differenzierendem Material verifiziert werden. Von großem Vorteil ist es wenn sich dabei ein Markerallel als diagnostisch für das Merkmal erweist. Dies ist selten der Fall und deshalb muß vor jeder Selektion anhand der Eltern untersucht werden ob der Marker im spaltenden Material differenziert.

Außerdem kann unter den Rückkreuzungsnachkommen auf den Genomanteil des rekkurrenten Elters selektiert werden. Dazu benötigt man ein Set von Mikrosatellitenmarkern, das eine gute Genomabdeckung gewährleistet. Mit diesen Markern wird dann auf hohe Genomanteile des rekkurrenten Elters selektiert.

Die dichteste Genomabdeckung mit Markern ist bei der markergestützten Selektion von QTLs (GELDERMANN 1975, TANKSLEY und HEWITT 1988) notwendig. Dabei wird versucht, quantitative Merkmale in einzelne Gene aufzulösen (STUBER et al. 1992, LI et al. 1995). Gleichzeitig erhält man Marker, die sehr eng mit diesen Genen gekoppelt sind. Mit diesen Markern kann man anschließend eine markergestützte Selektion auf das quantitative Merkmal durchführen.

Auch können Mikrosatellitenmarker zur Analyse und Charakterisierung von Genbankakzessionen verwendet werden. Dabei können die Sammlungen zum Beispiel auf Duplikate überprüft werden. Mikrosatellitenmarker wurden hierfür bereits bei Sojabohne (POWELL et al. 1996), Emmer (FAHIMA et al. 1998) oder Cassava (CHAVARRIAGA-AGUIRRE et al. 1999) angewendet.

Außerdem eignen sich Mikrosatellitenmarker für Untersuchungen in natürlichen Populationen. Dies wurde von CHASE et al. (1996) bei tropischen Bäumen, von AWADALLA und RITLAND (1997) bei der Gauklerblume und von STREIFF et al. (1998) bei der Stein-Eiche gezeigt. CHASE et al. untersuchten 56 Individuen aus zwei Populationen mit vier Mikrosatellitenmarkern und konnten jedem Samen den Vater und die Mutter zuordnen. Damit könnte z. B. der Genfluß zwischen den Populationen sehr genau analysiert werden.

Auch bei der Gattung *Beta* wurden bereits Mikrosatelliten eingesetzt (RAYBOULD et al., 1998; DESPLANQUE et al., 1999): DESPLANQUE et al. untersuchten französische *Beta*-Populationen mit RFLP- und einem Mikrosatellitenmarker. Sie konnten zeigen, daß Unkrautrüben nordfranzösischer Zuckerrübenanbaugebiete während der Vermehrung in Südfrankreich entstehen. Dabei kommt es zu spontanen Einstäubungen von ruderalen Binnenlandrüben in die Kulturformen. Der Mikrosatellitenmarker zeigte in den 82 untersuchten Populationen 26 verschiedene Allele.

4.7 Methodische Aspekte in der Routineanwendung

Die hier beschriebenen Anwendungen sind nicht spezifisch für Mikrosatellitenmarker. Sie können auch mit allen anderen Markertypen durchgeführt werden. Bei Kreuzungsnachweisen, der Bestimmung der genetischen Distanzen und der genetischen Kartierung erweist sich jedoch der hohe Polymorphiegrad, die codominante Vererbung und die gute Reproduzierbarkeit der Mikrosatellitenmarker als großer Vorteil.

Zusätzliche wichtige Vorteile der Mikrosatellitenmarker liegen in methodischen Aspekten der Routineanwendung. Sie können über eine standardisierte PCR-Reaktion amplifiziert werden. Die benötigte DNA-Menge ist mit 25-50 ng je Reaktion sehr gering. Die Detektion benötigt zwar eine hochauflösende Gelmatrix, wie zum Beispiel Polyacrylamid. Dies ist kosten- und arbeitsaufwendig. Diese Aufwendungen können jedoch durch entsprechend automatisierte Systeme extrem reduziert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden bereits automatische Sequenziergeräte zur Fragmentanalyse benutzt. Dabei ist keine Nachbereitung der Gele durch Anfärben mit Silber oder Ethidiumbromid mehr notwendig. Außerdem wird die Auswertung durch interne Größenstandards und die entsprechende Software stark erleichtert. Die Effizienz in diesem technischen Bereich kann allerdings noch wesentlich erhöht werden. In der Routineanwendung können Marker mit unterschiedlichen Größenbereichen der Allele gemeinsam in einer Gelspur aufgetragen werden. Außerdem kann man automatische Sequenziergeräte einsetzen, die verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig detektieren können. Dadurch können mehrere verschiedene Marker ohne Berücksichtigung ihrer Fragmentgrößenbereiche in einer Spur aufgetrennt werden. Werden diese beiden Möglichkeiten kombiniert, so können im optimalen Fall bis zu neun Marker in einer Spur aufgetrennt werden. Dabei würde mit drei Fluoreszenzfarbstoffen und drei Markern je Farbstoff gearbeitet. Solche Sets können dann für

häufig genutzte Routineanwendungen wie Fingerprint-Untersuchungen standardmäßig eingesetzt werden. Bei automatischen Sequenziergeräten mit Mehrfarbendetektion laufen die Größenstandards in einer separaten Farbe in jeder Spur. Dadurch ist eine sehr gute Größenbestimmung der Fragmente möglich. Durch neuere spezielle Software für Fragmentanalysen läßt sich die Auswertung in Routineprojekten nahezu vollständig automatisieren. Noch weiter automatisieren läßt sich die Mikrosatellitenanalyse durch den Einsatz von Kapillarelektrophoresegeräten. Diese arbeiten nahezu vollautomatisch, so daß kein Gießen von Gelen mehr notwendig ist. Dadurch ist fast ein 24-Stunden-Betrieb möglich.

Werden bestimmte Marker sehr häufig in der Routine zusammen analysiert, so können diese evtl. bereits in der PCR-Reaktion zusammen amplifiziert werden. Die Etablierung solcher Multiplexreaktionen kann aufwendig sein und es muß darauf geachtet werden, daß diese weiterhin so robust sind wie die Einzelreaktionen (MITCHELL et al. 1997).

Eine Alternative zur routinemäßigen Detektion von Mikrosatellitenpolymorphismen ist die Massenspektrometrie (BRAUN et al. 1997, ROSS und BELGRADER 1997). Der Vorteil dieser Methode liegt in der schnellen Detektion. Die Analyse einer Probe benötigt nur wenige Sekunden. Außerdem treten dabei nur geringe Materialkosten auf. Nachteil ist der analysierbare Größenbereich der Fragmente. Diese sollten unter 100 bp groß sein. Für sehr lange Mikrosatelliten ist das nicht immer realisierbar. Außerdem kann es durch die Art der Analyse vorkommen, daß bei imperfekten Mikrosatelliten nicht alle möglichen Polymorphismen in einer Reaktion detektiert werden können. Ein weiterer Nachteil ist, daß für jede Probe eine PCR-Reaktion und anschließend noch eine Sequenzierreaktion durchgeführt werden muß.

5 Zusammenfassung

Als Mikrosatelliten, oder auch Simple Sequence Repeats (SSR) oder Short Tandem Repeats (STR), werden DNA-Abschnitte bezeichnet, die sich aus einer mehrfachen Abfolge von kurzen DNA Sequenzmotiven zusammensetzen. Diese kurzen DNA Sequenzmotive (= Wiederholungseinheit) sind zwischen einer und fünf Basenpaaren lang. Die Mikrosatelliten zeichnen sich dadurch aus, daß sie durch eine unterschiedliche Anzahl an Wiederholungseinheiten in der Länge variieren. Durch die PCR (polymerase chain reaction) lassen sich solche Längenpolymorphismen gut detektieren. Die aus Mikrosatelliten entwickelten Marker zeigen einen hohen Polymorphiegrad, sind multiallelisch, kodominant und in großer Anzahl und mit gleichmäßiger Verteilung in eukaryotischen Genomen vorhanden.

Das Ziel dieser Arbeit war es, festzustellen ob Mikrosatelliten als molekulare Marker bei der Zuckerrübe (*Beta vulgaris* L.) in größerem Umfang genutzt werden können. Dazu sollte ermittelt werden wie häufig verschiedene Mikrosatellitenmotive im Genom vorkommen und welchen Polymorphiegrad sie im Vergleich zu anderen Markertypen oder aber zu Mikrosatellitenmarkern bei anderen Kulturpflanzen aufweisen. Außerdem sollte geklärt werden, ob die Mikrosatellitenmarker im Genom gleichmäßig verteilt sind.

Aus genomischen Phagenbanken der Zuckerrübe, mit Insertionen von 500 bis 1000 bp, wurden Klone mit den Mikrosatellitenmotiven $(GA)_n$, $(GT)_n$ und $(TGA)_n$ isoliert. Es wurden 205000 Klone über radioaktive Hybridisierung gesichtet. Dabei ergaben sich für die Dinukleotid-Motive Häufigkeiten von einem Mikrosatelliten pro 225 kb und für die Trinukleotid-Motive von 527 kb. Diese Abundanzen entsprechen in etwa denen in anderen Pflanzenarten. Es wurden 435 Klone sequenziert und 217 Mikrosatellitensequenzen gefunden. Diese zeigen sehr häufig eine imperfekte und/oder zusammengesetzte Struktur. Bei den $(GT)_n$ Mikrosatelliten waren 23% der Sequenzen homolog zu der Satelliten-DNA "BamHI" und konnten somit nicht als locusspezifische Marker verwendet werden. Durch die mehrfache Isolierung dieser Satelliten-DNA ergab sich eine schlechte Effizienz für das $(GT)_n$ -Motiv. Damit ist fraglich, ob dieses Motiv für die weitere Entwicklung einer großen Anzahl von Markern bei der Zuckerrübe genutzt werden sollte.

Insgesamt konnten aus 102 Sequenzen Primerpaare abgeleitet werden, von denen sich 71 als funktionale Marker erwiesen. Im Vergleich zu anderen Untersuchungen war hier die Markerentwicklung sehr effizient. Die Marker wurden als funktional definiert, wenn sie ein spezifisches Fragment der erwarteten Größe lieferten. Für die Dinukleotid-Motive sind das 61

(72%) und für das $(TGA)_n$ -Motiv zehn (59%) Marker. Damit war der Anteil funktionaler Marker bei den Dinukleotid-Motiven höher als bei dem $(TGA)_n$ -Motiv. Die Detektion der amplifizierten Fragmente erfolgte mit einem A.L.F.-DNA Sequenziergerät. Dazu wurde einer der beiden PCR-Primer mit dem Farbstoff Fluorescein markiert. In einem Satz aus 23 Zuckerrübenlinien wurde der Polymorphiegrad der funktionalen Marker untersucht. Dabei erwiesen sich 64 von 71 Marker als polymorph. Die Marker aus dem $(TGA)_n$ -Motiv waren alle polymorph. Bei den polymorphen Markern beträgt die Allelzahl je Locus im Durchschnitt 4,9 und reicht von 2 bis 13. Die PIC-Werte (polymorphism information content) haben einen Mittelwert von 0,58 und reichen von 0,17 bis 0,86. Dieser Polymorphiegrad der Mikrosatellitenmarker entspricht dem bei anderen Pflanzenarten. In dieser Arbeit gab es keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Motiven und Motivarten. Auch die Länge und die Struktur der Mikrosatelliten zeigten keinen Einfluß auf den Polymorphismus. Aus den Daten der 23 Linien wurde ein Dendrogramm der genetischen Ähnlichkeiten erstellt. Es zeigt sich eine sehr gute Differenzierung zwischen den Linien. Die Verwandtschaftsbeziehungen werden durch die Gruppierungen bestätigt.

Zum Vergleich der Mikrosatellitenmarker mit RFLP- und AFLP-Markern wurden neun Zuckerrübenlinien mit jeweils fünf Einzelpflanzen untersucht. Dabei ergeben sich hoch signifikante Korrelationen zwischen den genetischen Ähnlichkeiten, die sich aus den verschiedenen Markertypen ableiten. Zwischen den Linien zeigen die Mikrosatellitenmarker die geringsten genetischen Ähnlichkeiten. Innerhalb der Linien sind keine Unterschiede zwischen den Markertypen zu erkennen. Insgesamt weisen die Mikrosatellitenmarker im Vergleich zu RFLP- und AFLP-Markern einen höheren Polymorphiegrad auf. Dies ist auf den höheren durchschnittlichen Alleliegrad der Mikrosatellitenmarker zurückzuführen.

In die genetischen Kopplungskarten von zwei F_2 -Populationen konnten 33 Mikrosatellitenmarker (47%) integriert werden. Dabei sind die Marker gleichmäßig über die Chromosomen verteilt. Auch bei den $(GT)_n$ Mikrosatelliten zeigt sich keine Clusterbildung der Marker. Es gibt auch in dieser Hinsicht keine Unterschiede zwischen den Motiven und Motivarten. Damit ist es möglich, mit Hilfe von Mikrosatellitenmarkern, dichte genetische Kopplungskarten für die Zuckerrübe zu erstellen.

Mikrosatellitenmarker können potentiell vielfältig in der praktischen Zuckerrübenzüchtung eingesetzt werden. Hierzu gehören die Überprüfung von Handkreuzungen, die Ermittlung von genetischen Distanzen im Zuchtmaterial, die markergestützte Rückkreuzung und die markergestützte Selektion.

Weitere wichtige Vorteile der Mikrosatellitenmarker liegen in methodischen Aspekten der Routineanwendung. Hierbei sind zum Beispiel die gute Standardisierung, die gute Reproduzier- und Vergleichbarkeit und die geringe benötigte DNA-Menge (25-50 ng) zu nennen.

6 Literaturverzeichnis

- ABE, L. and C. TSUDA, 1988. Distorted segregation in the backcrossed progeny between *Beta vulgaris* L. and *B. macrocarpa* Guss. Jpn J Breed 38: 309-318.
- AKAGI, H., Y. YOKOZEKI, A. INAGAKI, and T. FUJIMURA, 1996. Microsatellite DNA markers for rice chromosomes. Theor Appl Genet 93:1071-1077.
- AKKAYA, M. S., A. A. BHAGWAT, and P. B. CREGAN, 1992. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. Genetics 132: 1131-1139.
- ANDERSON, J. A., G. A. CHURCHILL, J. E. AUTRIQUE, S. D. TANKSLEY, and M. E. SORRELS, 1993. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. Genome 38: 181-186.
- ARESHCHENKOVA, T. and M. W. GANAL, 1999. Long tomato microsatellites are predominantly associated with centromeric regions. Genome 42: 536-544.
- ARUMUGANATHAN, K., E. D. EARLY, 1991. Nuclear DNA content of some important plant species. Plant Mol Biol 9: 208-218.
- AWADALLA, P. and K. RITLAND, 1997. Microsatellite variation and evolution in the *Mimulus guttatus* species complex with contrasting mating systems. Mol Biol Evol 14: 1023-1034.
- BARZEN, E., W. MECHELKE, E. RITTER, J. F. SEITZER, and F. SALAMINI, 1992. RFLP markers for sugar beet breeding: chromosomal linkage maps and location of major genes for rhizomania resistance, monogerm and hypocotyl colour. The Plant Journal 2: 601-611.
- BARZEN, E., W. MECHELKE, E. RITTER, E. SCHULTE-KAPPERT, and F. SALAMINI, 1995. An extended map of sugar beet genome containing RFLP and RAPD loci. Theor Appl Genet 90: 189-193.
- BECKER, H., 1993. Pflanzenzüchtung. UTB für Wissenschaft: Uni-Taschenbücher, Bd. 1744.
- BECKER, J. and M. HEUN, 1995. Barley microsatellites: allele variation and mapping. Plant Molecular Biology 27: 835-845.
- BECKER, J., P. VOS, M. KUIPER, F. SALAMINI, and M. HEUN, 1995. Combined mapping of AFLP and RFLP markers in barley. Mol Gen Genet 249: 65-73.
- BECKMANN, J. S. and M. SOLLER, 1983. Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement: methodologies, mapping and costs. Theor Appl Genet 67: 35-43.
- BELL, C. J. and J. R. ECKER, 1994. Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of Arabidopsis. Genomics 19:137-144.
- BERNATZKY, R. and S. D. TANKSLEY, 1986. Methods for detection of single or low copy sequence in tomato on Southern blots. Plant Mol Biol Rep 4: 37-41.

- BLAIR, M. W. and S. R. MCCOUCH, 1997. Microsatellite and sequence-tagged site markers diagnostic for the rice bacterial leaf blight resistance gene *xa-5*. *Theor Appl Genet* 95: 174-184.
- BOHN, M., H. F. UTZ, and A. E. MELCHINGER, 1999. Genetic similarities among winter wheat cultivars determined on the basis of RFLPs, AFLPs, and SSRs and their use for predicting progeny variance. *Crop Science* 39: 228-237.
- BOSEMARK, N. O. and V. E. BORMOTOV, 1971. Chromosome morphology in a homozygous line of sugar beet. *Hereditas* 69: 205-212.
- BOTSTEIN, D., R. L. WHITE, M. SKOLNICK, and R. W. DAVIS, 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *Am. J. Hum. Genet.* 32:314-331.
- BOWCOCK, A. M., A. RUIZ-LINARES, J. TOMFOHRDE, E. MINCH, J. R. KIDD, and L. L. CAVALLI-FORZA, 1994. High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature* 368: 455-457.
- BRAUN, A. et al., 1997. Improved analysis of microsatellites using mass spectrometry. *Genomics* 46: 18-23.
- BREDEMEIJER, G. M. M., P. ARENS, D. WOUTERS, D. VISSER, and B. VOSMAN, 1998. The use of semi-automated fluorescent microsatellite analysis for tomato cultivar identification. *Theor Appl Genet* 97: 584-590.
- BROUN, P. and S. T. TANKSLEY, 1996. Characterisation and genetic mapping of simple repeat sequences in the tomato genome. *Mol Gen Genet* 250: 39-49.
- BRYAN, G. J., A. J. COLLINS, P. STEPHENSON, A. ORRY, J. B. SMITH, and M. D. GALE, 1997. Isolation and characterisation of microsatellites from hexaploid bread wheat. *Theor Appl Genet* 94: 557-563.
- BUTTERFAß, H., 1964. Die Chloroplastenzahlen in verschiedenartigen Zellen trisomer Zuckerrüben (*Beta vulgaris* L.). *Z. Botanik* 52: 46-77.
- CAI, D., M. KLEINE, S. KIFLE, H.-J. HARLOFF, N. N. SANDAL, K. A. MARCKER, R. M. KLEIN-LANGHORST, E. M. J. SALENTIJN, W. LANGE, W. J. STIEKEMA, U. WYSS, F. M. W. GRUNDLER, and C. JUNG, 1997. Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugar beet. *Science* 275: 832-834.
- CATO, S. A. and T. E. RICHARDSON, 1996. Inter and intraspecific polymorphism at chloroplast SSR loci and inheritance of plastids in *Pinus radiata* D. Don. *Theor Appl Genet* 93: 587-592.
- CHASE, M., R. KESSELI, and K. BAWA, 1996. Microsatellite markers for population and conservation genetics of tropical trees. *American Journal of Botany* 83: 51-57.

- CHAVARRIAGA-AGUIRRE, P., M. M. MAYA, J. TOHME, M. C. DUQUE, C. IGLESIAS, M. W. BONIERBALE, S. KRESOVICH, and G. KOCHERT, 1999. Using microsatellites, isozymes and AFLPs to evaluate genetic diversity and redundancy in the cassava core collection and to assess the usefulness of DNA-based markers to maintain germplasm collections. *Molecular Breeding* 5: 263-273.
- CHEN, E. J. and P. S. SEEBURG, 1985. Supercoiling sequencing: a simple method for sequencing plasmid DNA. *DNA* 4: 165-170.
- CHEN, X., S. TEMNYKH, Y. XU, Y. G. CHO, and S. R. MCCOUCH, 1997. Development of a microsatellite framework map providing genome-wide coverage in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet* 95: 553-567.
- CHIN, E. C. L., M. L. SENIOR, H. SHU, and J. S. C. SMITH, 1996. Maize simple repetitive DNA sequences: abundance and allele variation. *Genome* 39: 866-873.
- CONDIT, R. and S.P. HUBBELL, 1991. Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genomes. *Genome* 34: 66-71.
- DEPEIGES, A., C. GOUBELY, A. LENOIR, S. COCHEREL, G. PICARD, M. RAYNAL, F. GRELLET, and M. DELSENY, 1995. Identification of the most represented repeated motifs in *Arabidopsis thaliana* microsatellite loci. *Theor Appl Genet* 91:160-168.
- DESPLANQUE, B., P. BOUDRY, K. BROOMBERG, P. SAUMITOU-LAPRADE, J. CUGUEN, and H. VAN DIJK, 1999. Genetic diversity and gene flow between wild, cultivated and weedy forms of *Beta vulgaris* L. (*Chenopodiaceae*), assessed by RFLP and microsatellite markers. *Theor Appl Genet* 98: 1194-1201.
- DEVOS, K. M., G. J. BRYAN, A. J. COLLINS, P. STEPHENSON, and M. D. GALE, 1995. Application of two microsatellite sequences in wheat storage proteins as molecular markers. *Theor Appl Genet* 90: 247-252.
- DIETRICH, W., H. KATZ, S. E. LINCOLN, H. S. SHIN, J. FRIEDMAN, N. C. DRACOPOLI, and E. S. LANDER, 1992. A genetic map of the mouse suitable for typing intraspecific crosses. *Genetics* 131: 423-447.
- DIWAN, N. and P. B. CREGAN, 1997. Automated sizing of fluorescent-labeled simple sequence repeat (SSR) markers to assay genetic variation in soybean. *Theor Appl Genet* 95: 723-733.
- EDWARDS, A., A. CIVITELLO, H. A. HAMMOND, and C. T. CASKEY, 1991. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am. J. Hum. Genet.* 49: 746-756.
- EDWARDS, K. J., J. H. A. BARKER, A. DALY, C. JONES, and A. KARP, 1996. Microsatellite libraries enriched for several microsatellite sequences in plants. *BioTechniques*. 20: 758-760.
- EPPLEN, J. T., A. KYAS, and W. MÄUELER, 1996. Genomic simple repetitive DNAs are targets for differential binding of nuclear proteins. *FEBS Letters* 389: 92-95.
- ESTOUP, A., M. SOLIGNAC, M. HARRY, and J.-M. CORNUT, 1993. Characterisation of (GT)_n and (CT)_n microsatellites in two insect species: *Apis mellifera* and *Bombus terrestris*. *Nucleic Acids Res.* 21: 1427-1431.
- ERMAK, G. Z., M. I. PROSNYAK, A. A. VECHER, and N. A. KARTEL, 1990. AT repeats in barley genome. *FEBS Lett.* 272 (1-2): 193-196.

- FAHIMA, T., M. S. RÖDER, A. GRAMA, and E. NEVO, 1998. Microsatellite DNA polymorphism divergence in *Triticum dicoccoides* accessions highly resistant to yellow rust. *Theor Appl Genet* 96: 187-195.
- FEINBERG, A.P. and B. VOGELSTEIN, 1983. A technique for radiolabelling DNA restriction fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132: 6-13.
- FLAVELL, R. B., M. D. BENNET, and J. B. SMITH, 1974. Genome size and the proportion of repeated nucleotide sequence DNA in plants. *Biochem Genet* 12: 257-269.
- GELDERMANN, H., 1975. Investigations on inheritance of quantitative characters in animal by gene markers. I. Methods. *Theor Appl Genet* 46: 319-330.
- GIANFRANCESCHI, L., N. SEGLIAS, R. TARCHINI, M. KOMJANC, and C. GESSLER, 1998. Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple. *Theor Appl Genet* 96: 1069-1076.
- GROBEN, R., 1998. Mikrosatelliten bei der Zuckerrübe (*Beta vulgaris* L.) und ihre Verwendung als molekulare Marker. Dissertation Universität Hannover.
- HALLDÉN, C., A. HJERDIN, I. M. RADING, T. SÄLL, B. FRIDLUNDH, G. JOHANNISDOTTIR, S. TUVESON, C. ÅKESSON, and N.-O. NILSSON, 1996. A high density RFLP linkage map of sugar beet. *Genome* 39: 634-645.
- HAMADA, H., M. G. PETRINO, and T. KAKUNAGA, 1982. A novel repeated element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionary diverse eukariotic genomes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 79: 6465-6469.
- HUANG, W.-G., G. CIPRIANI, M. MORGANTE, and R. TESTOLIN, 1998. Microsatellite DNA in *Actinidia chinensis*: isolation, characterisation and homology in related species. *Theor Appl Genet* 97: 1269-1278.
- ITO, T., C. L. SMITH, and C. R. CANTOR, 1992. Sequence-specific DNA purification by triplex affinity capture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 495-498.
- JACCARD, P., 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull. Soc. Vaudoise Sci. Nat.* 44: 223-270.
- JARRET, R. L., L. C. MERRICK, T. HOLMS, J. EVANS, and M. K. ARADHYA, 1997. Simple sequence repeats in watermelon (*Citrellus lanatus*) (Thunb. Matsum & Nakai). *Genome* 40: 433-441.
- KANDPAL, R. P., G. KANDPAL, and S. M. WEISSMAN, 1994. Construction of libraries enriched for sequence repeats and jumping clones, and hybridisation selection for region-specific markers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 88-92.
- KARAGYOZOV, L., I. KALCHEVA, and V.M. CHAPMAN, 1993. Construction of random small-insert genomic libraries highly enriched for simple sequence repeats. *Nucleic Acids Research* 21: 3911-3912.
- KIJAS, J. M. H., J. C. S. FOWLER, C. A. GARBETT, and M. R. THOMAS, 1994. Enrichment of microsatellites from the citrus genome using biotinylated oligonucleotide sequences bound to streptavidin-coated magnetic particles. *BioTechniques* 16: 657-662.
- KOSAMBI, D. D., 1944. The estimation of map distances from recombination values. *Ann. Eugen.* 12: 172-175.
- KRESOVICH, S., A. K. SZEWC-MCFADDEN, S. M. BLIEK, and J. R. MCFERSON, 1995. Abundance and characterisation of simple-sequence repeats (SSRs) isolated from a size fractionated genomic library of *Brassica napus* L. (rapeseed). *Theor Appl Genet* 91:206-211.
- LAGERCRANTZ, J., H. ELLEGREN, and L. ANDERSSON, 1993. The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. *Nucleic Acids Research* 21: 1111-1115.

- LANDER, E. S., P. GREEN, J. ABRAHAMSON, A. BARLOW, M. J. DALY, S. E. LINCOLN, and L. NEWBURG, 1987. MAPMAKER: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1: 174-181.
- LANGE, W., W. A. BRANDENBURGER, and T. S. M. DE BROCK, 1999. Taxonomy and cultonomy of beet (*Beta vulgaris* L.). *Botanical Journal of the Linnean Society* 130: 81-96.
- LEVINSON, G. and G. A. GUTMAN, 1987. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol. Biol. Evol.* 4: 203-221.
- LITT, M. and J. A. LUTY, 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.* 44: 397-401.
- LITT, M., X. HAUGE, and V. SHARMA, 1993. Shadow bands seen when typing polymorphic dinucleotide repeats: some causes and cures. *BioTechniques* 15(2): 280-284.
- LIU, Z.W., R.M. BIYASHEV, and M.A. SAGHAI MAROOF, 1996. Development of simple sequence repeat DNA markers and their integration into a barley linkage map. *Theor Appl Genet* 93: 869-876.
- LI, Z., S. R. M. PINSON, J. W. STANSEL, and W. D. PARK, 1995. Identification of quantitative trait loci (QTLs) for heading date and plant height in cultivated rice (*Oryza sativa* L.) *Theor Appl Genet* 91: 374-381.
- MA, Z. Q., M. RÖDER, and M. E. SORRELLS, 1996. Frequencies and sequence characteristics of di-, tri-, and tetra-nucleotide microsatellites in wheat. *Genome* 39:123-130.
- MANTEL, N., 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res* 27: 209-220.
- MCCAULEY, D.E., 1995. The use of chloroplast DNA polymorphism in studies of gene flow in plants. *Trends Ecol. Evol.* 10: 195-202.
- MCFARLANE, J. S., 1971. Variety development. In: Johnson, R. T., Alexander, J., Rush, G. E. and G. R. Hawkes (eds). *Advances in sugar beet production, principles and practices*. Iowa State Univ. Press, Ames, Iowa, USA, pp. 401-435.
- MILBOURNE, D., R. C. MEYER, A. J. COLLINS, L. D. RAMSAY, C. GEBHARDT, and R. WAUGH, 1998. Isolation, characterisation and mapping of simple sequence repeat loci in potato. *Mol Gen Genet* 259: 233-245.
- MITCHELL, S.E., S. KRESOVICH, C. A. JESTER, C. J. HERNANDEZ, and A. K. SZEWC-MCFADDEN, 1997. Application of multiplex PCR and fluorescence-based, semi-automated allele sizing technology for genotyping plant genetic resources. *Crop Science* 37: 617-624.
- MOHAN, M., S. NAIR, A. BHAGWAT, T. G. KRISHNA, M. YANO, C. R. BHATIA, and T. SASAKI, 1997. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. *Molecular breeding* 3: 87-103.
- MOORE, S. S., L. L. SARGEANT, T. J. KING, J. S. MATTICK, M. GEORGES, and D. J. S. Hetzel, 1991. The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. *Genomics* 10: 654-660.
- MÖRCHEN, M., J. CUGUEN, G. MICHAELIS, C. HÄNNI, and P. SAUMITOU-LAPRADE, 1996. Abundance and length polymorphisms of microsatellite repeats in *Beta vulgaris* L. *Theor Appl Genet* 92: 326-333.

- MOREL, P., C. REVERDY, B. MICHEL, S. D. EHRLICH, and E. CASSUTO, 1998. The role of SOS and flap processing in microsatellite instability in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 10003-10008.
- MORGANTE, M. and A. M. OLIVIERI, 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. The Plant Journal 3:175-182.
- MULLIS, K., S. FALOONA, S. SCHARF, R. SAIKI, G. HORN, and H. EHRLICH, 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51: 263-273.
- NEI, M., 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proc Natl Acad Sci USA 70: 3321-3323.
- OSTRANDER, E. A., P. M. JONG, J. RINE, and G. DUYK, 1992. Construction of small-insert genomic DNA libraries highly enriched for microsatellite repeat sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 3419-3423.
- OWEN, F. V., 1945. Cytoplasmically inherited male-sterility in sugar beets. J. Agric. Res. 71: 423-440.
- PANAUD, O., X. CHEN, and S. R. MCCOUCH, 1995. Frequency of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). Genome 38: 1170-1176.
- PANAUD, O., X. CHEN, and S. R. MCCOUCH, 1996. Development of microsatellite markers and characterisation of simple sequence length polymorphism (SSLP) in rice (*Oryza sativa* L.). Mol Gen Genet 252: 597-607.
- PEJIC, I., P. AJMONE-MARSAN, M. MORGANTE, V. KOZUMPLICK, P. CASTIGLIONI, G. TARMINO and M. MOTTO, 1998. Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs, and AFLPs. Theor Appl Genet 97: 1248-1255.
- PILLEN, K., G. STEINRÜCKEN, G. WRICKE, R. G. HERRMANN, and C. JUNG, 1992. A linkage map of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Theor Appl Genet 84: 129-135.
- PILLEN, K., G. STEINRÜCKEN, R. G. HERRMANN, and C. JUNG, 1993. An extended linkage map of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) including nine putative lethal genes and the restorer gene X. Plant Breeding 111: 265-272.
- PLASCHKE, J., M. W. GANAL, and M. S. RÖDER, 1995. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. Theor Appl Genet 91: 1001-1007.
- POWELL, W., M. MORGANTE, C. ANDRE, M. HANAFEY, J. VOGEL, S. TINGEY, and A. RAFALSKI, 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. Molecular Breeding 2: 225-238
- PROVAN, J., W. POWELL, and R. WAUGH, 1996a. Microsatellite analysis of relationships within cultivated potato (*Solanum tuberosum*). Theor Appl Genet 92: 1078-1084.
- PROVAN, J., W. POWELL, and R. WAUGH, 1996b. Analysis of cultivated potato (*Solanum tuberosum*) using intermicrosatellite amplification. Genome 39: 767-769.
- RAFALSKI, J.A. and S. V. TINGEY, 1993. Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines. Trends Genet 9: 275-280.
- RAFALSKI, J. A., J. M. VOGEL, M. MORGANTE, W. POWELL, C. ANDRE, and S. V. TINGEY, 1996. Generating and using DNA markers in plants. In: Birren B., Lai E. (eds) Non-mammalian genomic analysis. A practical guide. Academic Press, New York pp 75-134.

- RAYBOULD, A. F., R. J. MOGG, C. ALDAM, C. J. GLIDDON, R. S. THORPE, and R.T. CLARKE, 1998. The genetic structure of sea beet (*Beta vulgaris* ssp. *maritima*) populations. III. Detection of isolation by distance at microsatellite loci. *Heredity* 80: 127-132.
- RIBAUT, J. M., X. HU, D. HOISINGTON, and D. GONZÁLEZ-DE-LEÓN, 1997. Use of STSs and SSRs as rapid and reliable preselection tools in a marker-assisted selection-backcross scheme. *Plant Molecular Biology Reporter* 15: 154-162.
- RIGAS, B., A. A. WELCHER, D. C. WARD, and S. M. WEISSMAN, 1986. Rapid plasmid library screening using RecA-coated biotinylated probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 9591-9595.
- RIVERA, R., K. J. EDWARDS, J. H. A. BARKER, G. M. ARNOLD, G. AYAD, T. HODGKIN, and A. KARP, 1999. Isolation and characterisation of polymorphic microsatellites in *Cocos nucifera* L. *Genome* 42: 668-675.
- RÖDER, M. S., V. KORZUN, K. WENDEHAKE, J. PLASCHKE, M. H. TIXIER, P. LEROY, and M. W. GANAL, 1998. A microsatellite map of wheat. *Genetics* 149:2007-2023.
- RÖDER, M., J. PLASCHKE, S. U. KÖNIG, A. BÖRNER, M. E. SORELLS, S. D. TANKSLEY, and M. W. GANAL, 1995. Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. *Mol. Gen. Genet.* 246: 327-333.
- ROHLF, F. J. and D. L. FISHER, 1968. Test for hierarchical structure in random data sets. *Systematic Zool.* 17: 407-412.
- ROHLF, F. J., 1993. NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 1.80. Owner manual.
- ROMAGOSA, I., L. CISTUE, T. TSUCHIYA, J. M. LASA, and R. J. HECKER, 1987. Primary trisomics in sugarbeet. II. Cytological identification. *Crop Sci.* 27: 435-439.
- RONGWEN, J., M.S. AKKAYA, A.A. BHAGWAT, U. LAVI, and P.B. CREGAN, 1995. The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification. *Theor Appl Genet* 90: 43-48.
- ROSS, P. L. and P. BELGRADER, 1997. Analysis of short tandem repeat polymorphisms in human DNA by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* 69: 3966-3972.
- ROYLE, N. J., R. E. CLARKSON, Z. WONG, and A. J. JEFFREYS, 1988. Clustering of hypervariable minisatellites in the proterminal regions of human autosomes. *Genomics* 3: 352-360
- RUSSEL, J., J. FULLER, M. MACAULARY, B. G. HATZ, A. JAHOOOR, W. POWELL, and R. WAUGH, 1997a. Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. *Theor Appl Genet* 95: 714-722.
- RUSSEL, J. R., J. D. FULLER, G. YOUNG, B. THOMAS, G. TARAMINO, M. MACAULAY, R. WAUGH and W. POWELL, 1997b. Discriminating between barley genotypes using microsatellite markers. *Genome* 40: 442-450.
- SANGER, F., S. NICKLEN, and A. R. COULSON, 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74(12): 5463-5467.
- SCHLÖTTERER, C. and D. TAUTZ, 1992. Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Research* 20: 211-215.
- SCHMIDT, T., C. JUNG, and M. METZLAFF, 1991. Distribution and evolution of two satellite DNAs in the genus *Beta*. *Theor Appl Genet* 82:793-799.

- SCHMIDT, T., K. BOBLENZ, M. METZLAFF, D. KAEMMER, K. WEISING, and G. KAHL, 1993. DNA fingerprinting in sugar beet (*Beta vulgaris*)-identification of double-haploid breeding lines. *Theor Appl Genet* 85: 653-657.
- SCHMIDT, T. and J. S. HESLOP-HARRISON, 1996a. The physical and genomic organisation of microsatellites in sugar beet. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8761-8765.
- SCHMIDT, T. and J. S. HESLOP-HARRISON, 1996b. High-resolution mapping of repetitive DNA by *in situ* hybridisation: molecular and chromosomal features of prominent dispersed and discretely localized DNA families from the wild beet species *Beta procumbens*. *Plant Molecular Biology* 30: 1099-1114.
- SCHONDELMAIER, J., G. STEINRÜCKEN, and C. JUNG, 1996. Integration of AFLP markers into a linkage map of sugar beet. *Plant Breeding* 115: 231-237.
- SCHONDELMAIER, J., and C. JUNG, 1997. Chromosome assignment of the nine linkage groups of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) using primary trisomics. *Theor Appl Genet* 95: 590-596.
- SCHUMACHER, K., J. SCHONDELMAIER, E. BARZEN, G. STEINRÜCKEN, D. BORCHARDT, W. E. WEBER, C. JUNG, and F. SALAMINI, 1997. Combining different linkage maps in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) to make one map. *Plant Breeding* 116: 23-38.
- SENIOR, M. L. and M. HEUN, 1993. Mapping maize microsatellites and polymerase chain reaction confirmation of the targeted repeats using a CT primer. *Genome* 36: 884-889.
- SENIOR, M. L., E. C. L. CHIN, M. LEE, J. S. C. SMITH, and C. W. STUBER, 1996. Simple sequence repeat markers developed from maize sequences found in the GENBANK database: Map construction. *Crop Science* 36: 1676-1683.
- SMITH, G. A., 1980. Sugarbeet. In: Fehr, W. R. and H. H. Hadley (eds). *Hybridisation of crop plants*. American Society of Agronomy and Crop Science Society of America, Madison, Wisconsin, USA, pp. 601-616.
- SMITH, G. A., 1987. Sugarbeet. In: Fehr, W. R.(eds). *Principals of cultivar developement*. Vol II: Crop species. Macmillan, NewYork. pp. 577-625.
- SMULDERS, M. J. M., G. BREDEMEIJER, W. RUS-KORTEKAAS, P. ARENS, and B. VOSMAN, 1997. Use of short microsatellites from database sequences to generate polymorphisms among *Lycopersicon esculentum* cultivars and accessions of other *Lycopersicon* species. *Theor. Appl. Genet.* 97: 264-272.
- SOKAL, R. R. and P. H. A. SNEATH, 1963. *Principles of numerical taxonomy*. Freeman, San Francisco 359 pp.
- STREIFF, R., T. LABBE, R. BACILIERI, J. STEINKELLNER, and A. KREMER, 1998. Within-population genetic structure in *Quercus robur* L. and *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. assessed with isozymes and microsatellites. *Mol. Ecol.* 7: 317-328.
- STRUSS, D. and J. PLIESKE, 1998. The use of microsatellite markers for detection of genetic diversity in barley populations. *Theor Appl Genet* 97: 308-315.
- STUBER, C. W., S. E. LINCOLN, D. W. WOLFF, T. HELENTJARIS, and E. S. LANDER, 1992. Identification of genetic factors contributing to heterosis in a hybrid from elite maize inbred lines using molecular markers. *Genetics* 132: 823-839.

- SUN, G.L., B. SALOMON, and P. VONBOTHMER, 1998. Characterisation of microsatellite loci from *Elymus alaskanus* and length polymorphism in several *Elymus* species (Triticeae: Poaceae). *Genome* 41: 455-463.
- TANKSLEY, S. D. and J. HEWITT, 1988. Use of molekular markers in breeding for soluble solids content in tomato - a re-eximination. *Theor Appl Genet* 75: 811-823.
- TARAMINO, G. and S. TINGEY, 1996. Simple sequence repeats for germplasm analysis and mapping in maize. *Genome* 39: 277-287.
- TAUTZ, D., M. TRICK, and G. A. DOVER, 1986. Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation. *Nature* 322: 652-656.
- TAUTZ, D., 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucl. Acids Res.* 17: 6463-6471.
- TAUTZ, D., 1993. Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences. In: S. D. J. Pena, R. Chakraborty, J. T. Epplen and A. J. Jeffreys (eds), *DNA fingerprinting: State of science*. Birkhäuser Verlag, Basel: 21-28.
- TAUTZ, D. and M. Renz, 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitiv components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Res* 12: 4127-4137.
- TAUTZ, D. and C. SCHLÖTTERER, 1994. Simple sequences. *Current opinion in Genetics and Development* 4: 832-837.
- UPHOFF, H. and G. WRICKE, 1995. A genetic map of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) based on RAPD markers. *Plant Breeding* 114: 355-357.
- VALLE, G., 1993. TA-Repeat microsatellites are closly associated with ARS consensus sequences in yeast chromosome III. *Yeast* 9: 753-759.
- WAGNER, H. and G. WRICKE, 1991. Genetic controls of five isozym systems in sugar beet. *Plant Breeding* 107: 124-130.
- WAGNER, W., E. WEBER, and G. WRICKE 1992. Estimating linkage relationship of isozyme markers and morphological markers in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) including families with distorted segregations. *Plant Breeding* 108: 89-96.
- WANG, D. G., J. B. FAN, C.-J. SIAO, A. BERNO, P. YOUNG, R. SAPOLSKY, G. GHANDOUR, N. PERKINS, E. WINCHESTER, J. SPENCER, L. KRUGLYAK, L. STEIN, L. HSIE, T. TOPALOGLOU, E. HUBBELL, E. ROBINSON, M. MITTMANN, M. S. MORRIS, N. SHEN, D. KILBURN, J. RIOUX, C. NUSBAUM, S. ROZEN, T. J. HUDSON, R. LIPSHUTZ, M. CHEE, and E. S. LANDER, 1998. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science* 280: 1077-1082.
- WEBER, J. L., P. E. MAY, 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet* 44: 388-396.

- WEBER, J. L., 1990. Informativeness of human (dC-dA)_n-(dG-dT)_n polymorphisms. *Genomics* 7: 524-530.
- WEIR, B. S., 1990. Genetic analysis methods for discrete genetic data. Sinauer Associates Incorporated, Sunderland Mass., USA.
- WEISING, K., R. G. ATKINSON, and R. C. GARDNER, 1995. Genomic fingerprinting by microsatellite-primer PCR: a critical evaluation. *PCR Meth. Appl.* 4: 249-255.
- WEISSENBACH, J., ed. 1992. The Genethon microsatellite map catalogue. Genethon, Evry, France.
- WILLIAMS, J. G. K., A. R. KUBELIK, K. LIVAK, J. A. RAFALSKI, and S. V. TINGEY, 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535.
- WONG, Z., V. WILSON, I. PATEL, S. POVEY, and A. J. JEFFREYS, 1987. Characterisation of a panel of highly variable minisatellites cloned from human DNA. *Ann. Hum. Genet.* 51: 269-288.
- WU, K. S. and S. D. TANKSLEY, 1993. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. *Mol Gen Genet* 241:225-235.
- WU, K. S., R. JONES, L. DANNEBERGER, and P. A. SCOLNIK, 1994. Detection of microsatellite polymorphisms without cloning. *Nucl. Acids Research* 22: 3257-3258.
- ZABEAU, M. and P. VOSS, 1993. Selective restriction fragment amplification: A general method for DNA fingerprinting. *Eur. Pat. App.* 92402629.7 (Publ. Number 0 534 858 A1).

7 Anhang

Tab. 7.1: Gaterslebener Zuckerrüben Mikrosatelliten (GZM) mit der Angabe der Herkunftsbank, der Nukleotidsequenz, dem Motivtyp (imp.= imperfekt) und der theoretischen PCR-Fragmentgröße in bp

| GZM | Bank | Nukleotidsequenz | Motiv bzw. Typ | Frag.-größe (bp) |
|------|------|---|--|------------------|
| 003 | C | GA(AG) ₂ (GA) ₄ G(GA) ₆ T(GA) ₄ G(GA) ₂ GT | (GA) _n imp. | 89 |
| 004 | C | (CT) ₇ (GT) ₁₄ | (GT) _n /(GA) _n | 128 |
| 005 | C | (GT) ₁₃ (GC) ₅ | (GT) _n /(GC) _n | 139 |
| 008 | C | GAAA(GA) ₂₃ GG(GA) ₄ (A) ₃ | (GA) _n imp. | 140 |
| 009 | C | (GTAT) ₃ (GT) ₁₈ ATG(AC) ₄ AA(T) ₈ | (GT) _n /(GTAT) _n imp. | 135 |
| 010 | C | (GA) ₁₉ CC(GT) ₃ | (GT) _n /(GA) _n imp. | 126 |
| 011 | C | (A) ₃ GA(G) ₄ (GA) ₄ GG(GA) ₃ GTGG(GA) ₂ (G) ₄ (GA) ₁₂ | (GA) _n imp. | 115 |
| 014 | C | (GA) ₅ AA(GA) ₂₆ | (GA) _n imp. | 140 |
| 015 | C | GAG(GA) ₂₆ TA(GT) ₆ | (GA) _n /(GT) _n imp. | 150 |
| 017 | F | (GT) ₁₉ | (GT) _n | 162 |
| 018 | C | (CT) ₄ (GT) ₃₉ (G) ₄ | (GT) _n /(GA) _n | 160 |
| 019 | C | GGA(GAA) ₇ (GA) ₂₂ G(GA) ₃ | (GA) _n /(GAA) _n imp. | 127 |
| 020 | C | (GT) ₄₁ | (GT) _n | 168 |
| 022 | F | (GA) ₂₃ | (GA) _n | 134 |
| 024 | C | (TCC) ₃ (CCCT) ₂ CTT(GT) ₄ (A) ₄ (GT) ₃₆ TT(GT) ₄ CT(GT) ₅ (GA) ₅ | (TCC) _n /(GT) _n /(GA) _n imp. | 202 |
| 025 | C | (GT) ₂ ATTAT(GT) ₁₃ G(CA) ₃ (N) ₁₅ (GT) ₇ | (GT) _n imp. | 158 |
| 026 | C | (GA) ₆ CA(GA) ₆ G(GA) ₂ | (GA) _n imp. | 180 |
| T026 | G | (G) ₃ (GT) ₁₀ G(GT) ₂ GG | (GT) _n imp. | 141 |
| 027 | C | (GT) ₁₆ GC(GT) ₃ A(TA) ₇ | (GT) _n /(TA) _n imp. | 121 |
| 028 | C | (TA) ₁₄ (GT) ₁₉ (G) ₃ | (GT) _n /(TA) _n | 182 |
| 029 | C | (GT) ₃₅ (TA) ₄ | (GT) _n /(TA) _n | 109 |

Fortsetzung Tab. 7.1:

| GZM | Bank | Nukleotidsequenz | Motiv bzw. Typ | Frag.-größe (bp) |
|-----|------|---|---|------------------|
| 030 | E | (GA) ₄ AACG(A) ₄ (GA) ₃ AG(A) ₆ (N) ₂₇ (GA) ₁₈ G G(A) ₃ (GA) ₂ | (GA) _n imp. | 154 |
| 032 | F | (TA) ₃ TT(GT) ₆₆ (TA) ₄ | (GT) _n /(TA) _n imp. | 272 |
| 033 | C | (TA) ₃₂ (GA) ₂₅ | (GA) _n /(TA) _n | 270 |
| 034 | C | (GA) ₂ G(GA) ₄ (A) ₃ GGCGAA(GA) ₈ TA(GA) ₁₃ GC(GA) ₁₂ (A) ₃ | (GA) _n imp. | 177 |
| 035 | C | (TA) ₅ T(GT) ₁₈ | (GT) _n /(TA) _n imp. | 141 |
| 038 | E | (GGAA) ₂ (GA) ₁₃ CA(GA) ₁₄ | (GA) _n imp. | 119 |
| 041 | C | (G) ₆ (A) ₄ GG(A) ₃ GGAA(GA) ₁₇ G(GA) ₃ (G) ₄ | (GA) _n imp. | 178 |
| 043 | C | (TA) ₆ T(GT) ₄₇ GC(GT) ₇ (GCGT) ₂ (GT) ₅ GC(GT) ₇ (N) ₄₇ (GT) ₃ (GC(GT) ₂) ₃ (CT) ₂ (GT) ₁₄ | (GT) _n /(TA) _n imp. | 363 |
| 044 | C | (GA) ₃ (A) ₄ ((GA) ₂ AA) ₄ (GA) ₂ A(GA) ₃ AA(GA) ₂ (A)GA | (GA) _n imp. | 113 |
| 045 | F | (T) ₁₂ CCT(GT) ₁₅ | (GT) _n | 141 |
| 049 | A | (TA) ₃₁ (GA) ₂₂ | (GA) _n /(TA) _n | 230 |
| 051 | E | (AAAG) ₂ AAGG(A) ₃ (GA) ₂₁ T(A) ₄ (T A) ₃ (T) ₅ | (GA) _n imp. | 115 |
| 052 | E | (GA) ₂₈ | (GA) _n | 138 |
| 053 | A | (GA) ₂₂ (A) ₄ (GA) ₄ | (GA) _n imp. | 182 |
| 056 | A | (CA) ₅ AACAGG(CA) ₂ (GA) ₆ GC(GA) ₁₇ A(GA) ₄ GG(GA) ₂ (G) ₄ CG(GA) ₂ (G) ₄ AGG(GA) ₄ GGAAGAGG(GA) ₂ AG(GA) ₂ (G) ₃ A(G) ₃ (G) ₄ (GA) ₁₅ | (GT) _n /(GA) _n imp. | 226 |
| 057 | C | (TA) ₈ | (TA) _n | 123 |

Fortsetzung Tab. 7.1:

| GZM | Bank | Nukleotidsequenz | Motiv bzw. Typ | Frag.-größe (bp) |
|-----|------|--|---|------------------|
| 058 | C | (GAAA) ₂ GCC(GA) ₂₀ AG(GA) ₂ GGA(G) ₃ | (GA) _n imp. | 293 |
| 059 | A | (GA) ₅ TA(GA) ₉ (G) ₃ AGG(GA) ₁₇ | (GA) _n imp. | 141 |
| 060 | C | G(GA) ₂ ACAG(GA) ₂₀ | (GA) _n imp. | 100 |
| 063 | E | (GA) ₃ TATAATCA(TA) ₂₁ (GA) ₁₈ CA(GA) ₃ C A(GA) ₁₇ GGA(GA) ₄ CAAA(CA) ₃₇ | (GA) _n /(GT) _n /(TA) _n imp. | 292 |
| 066 | A | (GA) ₂₆ | (GA) _n | 124 |
| 067 | C | (GA) ₂₅ | (GA) _n | 130 |
| 068 | E | (GA) ₃ GG(GA) ₂₇ | (GA) _n imp. | 353 |
| 071 | A | (TA) ₁₄ (GA) ₂₈ (N) ₁₀ (GA) ₁₁ | (GA) _n /(TA) _n imp. | 205 |
| 072 | A | (A) ₆₅ | (A) _n | 183 |
| 075 | F | (TA) ₂₇ T(GT) ₂₁ AT(GT) ₅ GG(GT) ₂ | (GT) _n /(TA) _n imp. | 214 |
| 078 | A | (GA) ₁₉ (GGGA) ₂ (G) ₄ (GA) ₃ (GGGA) ₃ (GA) ₁₂ | (GA) _n /(GGGA) _n imp. | 176 |
| 080 | C | (CT) ₁₁ (TA) ₈ TGTACA(TG) ₅ (TA) ₄ TGTACA A(GT) ₃₀ (AT) ₂ | (GA) _n /(GT) _n /(TA) _n imp. | 180 |
| 081 | E | (GA) ₂₃ | (GA) _n | 73 |
| 083 | F | (GT) ₁₅ C(GT) ₆ | (GT) _n imp. | 131 |
| 084 | F | (GA) ₂₆ | (GA) _n | 220 |
| 085 | F | (GA) ₆ (N) ₈₅ (GA) ₆ AA(GA) ₃ AG(A) ₃ GG(GA) ₂ (N) ₁₁ (GA) ₂₃ (G) ₃ | (GA) _n imp. | 291 |
| 086 | F | GAAA(GA) ₁₈ (GTGA) ₈ | (GA) _n /(GTGA) _n | 194 |
| 087 | F | (GA) ₄ TA(GA) ₁₁ (GT) ₂ AT(GT) ₂₁ TT(GT) ₉ | (GA) _n /(GT) _n imp. | 236 |
| 091 | F | G(A) ₄ GGAGG(GA) ₂₄ | (GA) _n | 136 |
| 094 | G | (TG) ₂ (GT) ₋₁₈ (GC) ₃ | (GT) _n /(GC) _n imp. | 152 |
| 097 | C | (GA) ₄ (N) ₁₇ (GA) ₆ (A) ₆ | (GA) _n imp. | 146 |

Fortsetzung Tab. 7.1:

| GZM | Bank | Nukleotidsequenz | Motiv bzw. Typ | Frag.-größe (bp) |
|------|------|---|---|------------------|
| 101 | A | (TA) ₈ (TAA) ₂ T(A) ₄ TG(TTA) ₂ | (TA) _n /(TAA) _n imp. | 137 |
| 102 | A | (GT) ₆ | (GT) _n | 145 |
| 106 | C | GAG(GA) ₁₀ GGAG | (GA) _n imp. | 102 |
| T003 | G | (A) ₅ (GAAAAAA) ₄ (A) ₅ | (GAAAAAA) _n | 311 |
| T005 | C | (AAG) ₃ A(TGA) ₁₃ | (AAG) _n /(TGA) _n imp. | 124 |
| T009 | F | (TGA) ₆ T(TGA) ₂ T(TGA) ₄ TA(ATA) ₃₄ | (TGA) _n /(ATA) _n imp. | 186 |
| T010 | E | (TGA) ₃ TGT(TGA) ₄ (TAA) ₂ (TGA) ₅ TA(ATA) ₄ | (TGA) _n /(ATA) _n imp. | 270 |
| T011 | E | (TGA) ₃ (TAATGATGTA(TGA) ₄) ₂ (T) ₃ A(TGA) ₃ | (TGA) _n imp. | 178 |
| T013 | A | (AG) ₃ (ATA) ₂₀ A(TGA) ₁₄ TA(ATA) ₂₂ (A) ₃ (ATA) ₉ AC A(ATA) ₆ TATTA(ATA) ₂ (TTA) ₃ (ATA) ₃ | (TGA) _n /(ATA) _n imp. | 314 |
| T014 | C | ((ATA) ₃ GTA) ₂ ATAGTA(ATA) ₄ TAA(TA) ₂ (ATA) ₅ TA(ATA) ₄ (ATT) ₂ ATAATT(A) ₅ (ATA) ₃ TA(ATA) ₄ A(TGA) ₁₃ | (TGA) _n /(ATA) _n imp. | 266 |
| T016 | C | (TGA) ₁₇ (N) ₃₅ (TGA) ₁₁ | (TGA) _n imp. | 199 |
| T020 | G | (TTG) ₃ (TGG) ₃ TTGTGG((TTG) ₂ TGG) ₂ (TTG) ₇ (T GGTTG) ₄ (TGG) ₃ (TTGTGG) ₂ (TTG) ₅ (TGG) ₂ (TTGTGG) ₂ TGG(TTG) ₄ TGGTTG | (TTG) _n /(TGG) _n imp. | 219 |
| T021 | G | (TGA) ₆ | (TGA) _n | 111 |

Tab. 7.2: Gaterslebener Zuckerrüben Mikrosatelliten (GZM) mit ihren Allelgrößenbereichen, der Anzahl Allele, den PIC-Werten, den Spaltungsverhältnissen, den Chromosomenpositionen und der Angabe über den Einsatz im Markervergleich

| GZM | Allelgrößenbereich (bp) | Anzahl Allele | PIC | Spaltung | Chromosom | Markervergleich |
|------|-------------------------|---------------|------|-------------------|---------------|-----------------|
| 003 | 63-89 | 3 | 0,54 | 10:46:23 | 9502: VI | x |
| 004 | 128-188 | 4 | 0,48 | - | - | x |
| 005 | 139 | 1 | - | - | - | - |
| 008 | 140-153 | 3+0 | - | 23:46:9/ 30:89 | 9502/9704: IV | x |
| 009 | 126-144 | 4 | 0,37 | - | - | x |
| 010 | 97-140 | 7 | 0,78 | 28:64:24 | 9704: VI | x |
| 011 | 113-115 | 3 | - | - | - | - |
| 014 | 86-140 | 6 | - | 20:42:16 | 9502: VI | x |
| 015 | 139-184 | 8 | - | - | - | - |
| 017 | 151-182 | 6 | 0,70 | 20:49:10 | 9502: VI | x |
| 018 | 123-165 | 6 | - | - | - | - |
| 019 | 135-137 | 2+0 | 0,17 | - | - | x |
| 020 | 116-168 | 7 | 0,75 | 12:50:15 | 9502: VII | x |
| 022 | 122-157 | 2 | 0,23 | - | - | x |
| 024 | 145-194 | 4 | - | 10:46:23 | 9502: IV | x |
| 025 | 147-166 | 4 | 0,44 | - | - | x |
| 026 | 180-184 | 2 | 0,46 | - | - | x |
| T026 | 141-144 | 3 | 0,50 | 27:42:24 | 9704: II | x |
| 027 | 121 | 1 | - | - | - | - |
| 028 | 201-370 | 8 | - | 27:85 | 9704: IX | - |
| 029 | 127-180 | 4 | - | - | - | - |
| 030 | 154-168 | 4 | 0,72 | 10:54:15 | 9502: IV | x |
| 032 | 296 | 1 | - | - | - | - |
| 033 | 173-224 | 9 | - | - | - | x |
| 034 | 141-151 | 3 | 0,45 | - | - | - |

Fortsetzung Tab. 7.2:

| GZM | Allelgrößenbereich (bp) | Anzahl Allele | PIC | Spaltung | Chromosom | Markervergleich |
|-----|-------------------------|---------------|------|---------------------|--------------|-----------------|
| 035 | 152-162 | 3 | - | - | - | x |
| 038 | 97-127 | 3 | 0,36 | 23:35:15 | 9502: III | x |
| 041 | 199-201 | 2 | - | 20:49:48 | 9704: IX | - |
| 043 | 361-369 | 5+0 | 0,71 | - | - | - |
| 044 | 113 | 1 | - | - | - | - |
| 045 | 139-143 | 3 | 0,63 | - | - | x |
| 049 | 230-256 | 6 | - | - | - | - |
| 051 | 101-125 | 5 | 0,70 | 28:62:29 | 9704: I | x |
| 052 | 103-144 | 6 | 0,74 | 33:63:24 | 9704: VI | x |
| 053 | 173-207 | 6 | 0,78 | 15:51:8 | 9502: IV | x |
| 056 | 213-228 | 3 | 0,20 | - | - | x |
| 057 | 121-127 | 4 | - | - | - | x |
| 058 | 293-321 | 6 | 0,59 | 14:53:10 | 9502: IV | x |
| 059 | 106-141 | 4 | 0,53 | 5:46:26/ 55:55:6 | 9502/9704: V | x |
| 060 | 89-170 | 5 | - | 26:36:17 | 9502: III | x |
| 063 | 250-302 | 5 | 0,64 | 18:46:13 | 9502: I | - |
| 066 | 103-127 | 5 | 0,57 | 14:40:20 | 9502: IV | x |
| 067 | 130 | 1 | - | - | - | - |
| 068 | 294-380 | 8 | 0,72 | 25:43:9/ 60:52:7 | 9502/9704: V | - |
| 071 | 183-205 | 3 | 0,34 | 28:67:25 | 9704: IV | x |
| 072 | 168-190 | 10+0 | 0,84 | 26:57:20 | 9704: VII | x |
| 075 | 175-214 | 6 | 0,75 | - | - | - |
| 078 | 144-178 | 3 | 0,26 | 31:88 | 9704:I | x |
| 080 | 94-222 | 8 | - | - | - | - |

Fortsetzung Tab. 7.2:

| GZM | Allelgrößenbereich (bp) | Anzahl Allele | PIC | Spaltung | Chromosom | Markervergleich |
|------|-------------------------|---------------|------|----------|-----------|-----------------|
| 081 | 89-94 | 2 | 0,28 | - | - | x |
| 083 | 194-307 | 11 | 0,82 | - | - | - |
| 084 | 176-178 | 2 | - | - | - | - |
| 085 | 338-374 | 9 | 0,74 | - | - | - |
| 086 | 162-209 | 7 | 0,83 | 22:74:19 | 9704: III | x |
| 087 | 236-251 | 2+0 | 0,52 | 39:80 | 9704: VII | - |
| 091 | 106-163 | 9 | 0,79 | 21:42:16 | 9502: VII | x |
| 094 | 152 | 1 | - | - | - | - |
| 097 | 146-150 | 3 | 0,55 | - | - | - |
| 101 | 145 | 1 | - | - | - | - |
| 102 | 152 | 1 | - | - | - | - |
| 106 | 97-102 | 2 | 0,48 | 35:53:31 | 9704: VII | x |
| T003 | 295-311 | 4 | 0,45 | - | - | x |
| T005 | 117-133 | 3 | 0,60 | 20:98 | 9704: IV | - |
| T009 | 158-311 | 13 | 0,86 | 23:69:26 | 9704:IV | x |
| T010 | 268-283 | 3 | 0,29 | - | - | x |
| T011 | 156-178 | 3 | - | - | - | - |
| T013 | 254-338 | 8 | - | - | - | x |
| T014 | 266-298 | 5 | - | 23:44:25 | 9704: I | x |
| T016 | 182-201 | 5 | 0,56 | - | - | - |
| T020 | 219-222 | 2 | - | - | - | - |
| T021 | 98-111 | 2 | 0,42 | 18:45:16 | 9502: I | - |

Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich mich mit der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit erstmals um die Erlangung eines Doktorgrades bewerbe.

Die Arbeit wurde von mir selbstständig und ohne fremde Hilfe verfaßt. Es wurden nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Murten, im Dezember 2001

Jost Dörnte

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am IPK-Gatersleben in der Arbeitsgruppe Gen- und Genomkartierung erstellt.

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. H. H. Geiger für die Schirmherrschaft über diese Arbeit und die Offenheit gegenüber dem Thema.

Herrn Dr. habil. Martin Ganai danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas und die jederzeit gewährte Unterstützung und Diskussionsbereitschaft während der Arbeit.

Prof. Dr. Geldermann danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Mein Dank gilt auch Frau Dr. Marion Röder. Durch die von ihr sehr gut etablierte Methodik und Laborausstattung wurde meine Arbeit sehr erleichtert.

Mein ganz besonderes Dankeschön geht an Frau Ellen Weiß für ihre gute technische Hilfe und ihre dabei allzeit positive und humorvolle Einstellung.

Dr. Dietrich Borchardt (KWS Saat AG) danke ich für die Bereitstellung des gesamten Pflanzenmaterials und der zusätzlichen Markerinformationen. Auch für die Möglichkeit praktische Aspekte der Zuckerrübenzüchtung kennenzulernen, für sein entgegengebrachtes Interesse an meiner Arbeit und die Durchsicht des Manuskriptes danke ich ihm.

Ich danke ganz herzlich allen Mitarbeitern der AG Gen- und Genomkartierung. Die herzliche und persönliche Arbeitsatmosphäre trug viel zu meiner Motivation bei. Auch waren sie alle jederzeit für fachliche oder persönliche Fragen und Probleme offen.

Nicht zuletzt danke ich Reinhild für die schöne Zeit in Quedlinburg und das Akzeptieren der vielen mit dieser Arbeit verplanten Wochenenden.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Jost Dörnte
Geburtsdatum und -ort: 08.08.1969 in Northeim
Eltern: Vater: Landwirtschaftsmeister Justus Dörnte
Mutter: Hauswirtschaftsmeisterin Ilse Dörnte, geb. Sander
Familienstand: seit 08.06.2001 verheiratet mit Reinhild Dörnte, geb. Fischer

Schulbildung

1976-1986 Grund- und Realschule Moringen
1986-1989 Fachgymnasium Wirtschaft Northeim mit Abitur

Wehrdienst

01.06.1989-31.08.1990

Hochschulstudium

01.10.1991-02.10.1996 Studium der Agrarbiologie an der Universität Hohenheim

Praktische Tätigkeiten

16.09.1990-30.09.1991 Landwirtschaftliches Praktikum auf dem Betrieb
Pferdmenges/Hilprechtshausen mit Praktikantenprüfung
02.08.-29.09.1993 Praktikum bei Perryfields Seeds Limited in England
Nov.1994-Aug.1996 Tätigkeit als Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für
Pflanzenzüchtung, Saatgutforschung und Populationsgenetik
der Universität Hohenheim

Berufliche Tätigkeit

04.11.1996-14.02.1999 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am IPK Gatersleben in der
Arbeitsgruppe Gen- und Genomkartierung
15.02.1999-31.12.2000 Wissenschaftlicher Mitarbeiter bei der PLANTA GmbH in
Einbeck in der Arbeitsgruppe Molekulare Marker
seit 01.02.2001 Getreidezüchter bei der DSP AG in Delley, Schweiz