

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Pflanzenmaterial

Ausgangspunkt für die Untersuchungen waren Hanfpflanzen der ungarischen Sorte ‘Kompolti’ (diözisch), der Sorten ‘Northern Light’ und ‘White Widow’ sowie der beiden diözischen Abstammungen CAN17 und CAN18, die uns freundlicherweise von der Genbank Gatersleben (IPK, Gatersleben)¹ zur Verfügung gestellt wurden.

Für die Durchführung einer Bulkanalyse zur Entwicklung geschlechtsgekoppelter Marker wurden im Sommer 1998 18 Pflanzen (10 männliche und 8 weibliche) der diözischen Abstammung CAN17 sowie 32 Pflanzen (16 männliche und 16 weibliche) der diözischen Abstammung CAN18 im Freiland bonitiert. Von diesen Pflanzen wurde Blattmaterial zur DNA-Gewinnung abgenommen.

Weiterhin wurden zahlreiche Kreuzungen durchgeführt, in dem männliche und weibliche Hanfpflanzen gemeinsam unter einer Folienhaube zur Blüte gebracht wurden. Lediglich eine Kreuzung zwischen den Pflanzen CAN18/1 und CAN18/2 führte mit einer Anzahl von 81 F₁-Nachkommen zu einer Population ausreichender Größe. Die Pflanzen dieser Population wurden mit A2/ (A steht für das Aussaatjahr 1999 und 2 ist die Nummer der Population) und einer entsprechenden Pflanzennummer bezeichnet. Das resultierende Saatgut dieser Kreuzung wurde geerntet und im Winter 1998/1999 im Phytotron ausgesät. Zur gleichen Zeit wurden im Phytotron 30 Einzelpflanzen (24 weibliche und 6 männliche) der diözischen Abstammung CAN17 (Population A7) angezogen. Sowohl die 81 F₁-Pflanzen von CAN18 als auch die 30 Einzelpflanzen von CAN17 wurden nach 4 Wochen in 8cm Plastiktöpfe gepflanzt und für die weitere Anzucht ins Gewächshaus überführt.

¹ http://tox-serv.ipk-gatersleben.de/scripts/vtpcgitp.pl?IDCFile=/idc_htx/sbot.idc

3.1.2. Bakterien und Vektoren

Für die Erstellung der genomischen Bank wurde der Laborstamm *Escherichia coli* Dh10B verwendet. Als Vektor diente der Phagemidvektor pBluescript SK⁻ (Stratagene, Heidelberg²). Die Klonierung von PCR-Produkten erfolgte in den Vektor PCR 2.1-TOPO[®] (Invitrogen, Groningen³), welcher in die zugehörigen One Shot[™] Zellen transformiert wurde.

3.1.3. Zusammensetzung von Puffern und verwendete Chemikalien

AFLP-Filler	5mg Blue Dextran in 1ml deionisiertem Formamid lösen
Agarosegel	0,8 -2% Agarose in 1x TAE-Puffer durch aufkochen lösen, auf ca. 60°C abkühlen und 0,5µg/ml Ethidiumbromid zugeben
5M Ammoniumacetat	38,55g NH ₄ Ac lösen, auf 100ml auffüllen und anschließend sterilfiltrieren
10% APS	Ammoniumperoxidsulfat lösen und aliquotieren
76%EtOH/ 10mM NH ₄ AC	
Ampicillin (Stock)	50mg/ml Ampicillin lösen und anschließend sterilfiltrieren Aliquots bei -20°C lagern
Bindesilan	3µl Bindesilan in 1000µl EtOH lösen und bei -20°C lagern

² http://www.stratagene.com/vectors/maps/pdf/pBluescript_sk_plus.pdf

³ http://www.invitrogen.com/content/vectors/pcr2_1topo_map.pdf

- Material und Methoden -

Blocking stock solution	10% Blocking Reagenz in DIG-B I Puffer lösen
CSPD:Detektionspuffer (1:100)	1ml CSPD mit 99ml Detektionspuffer mischen
CTAB-Extraktionspuffer	100mM Tris pH 7,5; 0,7M NaCl; 10mM EDTA lösen und autoklavieren, vor Gebrauch 1% CTAB und 1% β -Mercapto-Äthanol zugeben
Denaturierungspuffer	0,5M NaOH; 1,5M NaCl
Detektionspuffer	0,1M Tris-HCl; 0,1M NaCl, pH 9,5
Diffusionspuffer	0,5M Natriumacetat; 10mM MgAc; 1mM EDTA pH 8,0; 0,1% SDS in autoklaviertem H ₂ O lösen
DIG-B I-Puffer	0,15M NaCl; 0,1M Maleinsäure; pH 7,5 einstellen
DIG-B II-Puffer	Blocking Stock solution: DIG-B I = 1 : 10
DIG-B III-Puffer	0,1M Tris pH 9,5; 0,1M NaCl; 50mM MgCl
DIG-Hybridisierungspuffer	5x SSC; 0,1% (w/v) Lauroylsarcosine; 0,02% (w/v) SDS; 1% Blocking Reagenz
DIG-Waschpuffer	DIG-B I + 0.3% Tween 20
0,5M EDTA	0,5M EDTA, mit NaOH auf pH 8,0 einstellen

- Material und Methoden -

Ethidiumbromid	1mg/ml; Gefäß in Alufolie einwickeln und bei 4°C lagern
FB-Medium	10g/l Bacto-Trypton; 5g/l Hefeextrakt; 5g/l NaCl; 8,28g/l $K_2HPO_4 \times 3H_2O$; 0,45g/l Na-Citrat; 0,9g/l $MgSO_4 \times 7H_2O$; 1,8g KH_2PO_4 ; 55,44g/l Glycerin; nach dem Autoklavieren 50-100µg/ml Ampicillin zugeben
IPTG	24mg IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside)/ml
Ladepuffer 1	0,25% Xylene Cyanol FF; 40% (w/v) Saccharose
Ladepuffer 2	0,25% Bromphenolblau; 40% (w/v) Saccharose
LB-Medium	10g Bacto-Trypton; 5g Bacto-Yeast Extrakt; 10g NaCl; pH 7,0 mit 5N NaOH einstellen
LB-Platten	1l LB-Medium mit 15g Agarose autoklavieren; abkühlen auf 50°C 32mg/l X-Gal; 7,68mg/l IPTG; 50-100mg/l Ampicillin zugeben Platten gießen und kühlen lassen; mit Parafilm abdichten und bei 4°C lagern; 1-2h vor Gebrauch aufwärmen lassen
3M Natriumacetat	3M Natriumacetat, mit Eisessig pH 5,2 einstellen
76% EtOH/ 0,2M NaAc	76ml EtOH; 2ml 10M NaOH auf 100ml auffüllen
Neutralisierungspuffer	1M Tris; 1,5M NaCl; mit HCl pH 7,5 einstellen
40% PAA 19:1	76g Polyacrylamid; 4g N,N'-Methylen-bis-acrylamid; mit autoklaviertem H_2O auf 200ml auffüllen

- Material und Methoden -

PAA-Gel (denaturierend)	7M Urea; 6% PAA (19:1); 1x TBE-Puffer
PAA-Gel (nichtdenaturierend)	5% PAA (19:1); 1x TBE-Puffer
Plasmidlösung I	50mM Glucose; 25mM Tris pH 8,0; 10mM EDTA pH 8,0; vor Gebrauch 3mg/ml Lysozym einwiegen
Plasmidlösung II	0,2N NaOH; 1% SDS immer frisch mit autklaviertem H ₂ O herstellen
Plasmidlösung III	5M Kaliumacetat; 1,8M Eisessig
1x RL-Puffer	10mM Tris/HCl; 10mM Mg-Acetat; 50mM K-Acetat; 5mM DTT pH 7,5
SOB-Medium	20g Trypton; 5g Hefeextrakt; 0,5g NaCl; 2,5mM KCl; 10mM MgCl ₂ ; pH 7,0
SOC-Medium	20g Trypton; 5g Hefeextrakt; 0,5g NaCl; 2,5mM KCl; 10mM MgCl ₂ ; 20mM Glucose; pH 7,0
20x SSC (Transferpuffer)	0,3M Natriumcitrat; 3M Natriumchlorid; pH 7,0 einstellen
Stripppuffer	0,5M NaOH; 0,1% SDS
50x TAE	2M Tris-Acetat; 50mM EDTA pH 8,0

- Material und Methoden -

10x TBE	242,28g Tris; 102,64g Borsäure; 7,44g EDTA auf 2l auffüllen
TE-Puffer	10mM Tris pH 8,0; 1mM EDTA pH 8,0
1M Tris	1M Trisbase; mit HCl pH-Wert einstellen
Waschpuffer 1	2x SSC; 0,5% SDS
Waschpuffer 2	0,3x SSC; 0,5% SDS
X-Gal	22,5mg X-Gal/ml in N'N'-Dimethylformamid lösen

3.2. Methoden

3.2.1. Erstellung des Ausgangsmaterials für die DNA-Gewinnung

Das Saatgut der ungarischen Sorte ‘Kompolti’ sowie der beiden diözischen Abstammungen CAN17 und CAN18 wurde, wie bei **Schumann et al. (1999)** beschrieben, Anfang Mai 1998 von Hand in 3m² große Parzellen, bestehend aus maximal 5 Reihen von 1m Länge und 50cm Reihenabstand zueinander ausgesät.

Für die Erstellung gezielter Kreuzungen erfolgte die Isolierung weiblicher Hanfpflanzen unter Folienhauben (**Crescini, 1940**). Zum Zeitpunkt der Blüte wurde der Blütenstand einer männlichen Pflanze mit unter die Haube gebunden.

Eine andere Möglichkeit der gezielten Bestäubung weiblicher Pflanzen bestand darin, männliche und weibliche Elternpflanzen gemeinsam unter einer Haube zu isolieren. Nach der Abblüte und Reife der Samen wurden die Foliehauben entfernt und das Saatgut geerntet.

Die aus der Kreuzung einer weiblichen Pflanze mit einer männlichen Pflanze von CAN18 resultierenden 81 F₁-Nachkommen (48 weibliche und 33 männliche), sowie 30 Einzelpflanzen der diözischen Abstammung CAN17 (24 weibliche und 6 männliche) wurden vier Wochen im Phytotron mit einer Lichtphase von 18h Licht, 26°C und 60% Luftfeuchte und einer Dunkelphase von 6h Dunkelheit bei 18°C und 60% Luftfeuchte angezogen. Die ersten beiden Wochen erfolgte dies in Anzuchtschalen und später in Plastiktöpfen mit einem Durchmesser von 8cm. Nach vier Wochen wurden die Pflanzen ins Gewächshaus überführt. Alle Pflanzen wurden hinsichtlich des Geschlechtes bonitiert. Dabei erfolgte die Bonitur an Freilandpflanzen einmal zu Beginn der Blüte anhand der Infloreszenzen. Alle Gewächshauspflanzen wurden im Verlauf der Blüte viermal bonitiert. Dabei wurden anhand der Infloreszenzen männliche und weibliche Pflanzen unterschieden. Zusätzlich erfolgte die Kontrolle aller Pflanzen auf das Vorhandensein einzelner andersgeschlechtlicher Blütenorgane an den Seitentrieben, am Stamm bzw. in den Blattachseln. Die Boniturdaten für alle untersuchten Pflanzen sind in Tabelle A1 in der Anlage dargestellt.

3.2.2. DNA-Isolierung (Saghai Maroof et al., 1984)

Von allen Pflanzen wurden junge Blätter abgenommen, in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -80°C gelagert.

400mg frisches bzw. tiefgefrorenes Blattmaterial wurden unter flüssigem N₂ gemörsert und mit 9ml CTAB-Extraktionspuffer für 30min bei 65°C inkubiert. Nach Zugabe von 4,5ml CHCl₃/Oktanol (24:1) und 5min Mischen fand eine Zentrifugation für 5min bei 1000x g und 20°C statt. Die wässrige Phase wurde abgenommen, und die darin gelöste DNA durch Zugabe von 10ml eiskaltem Äthanol (-20°C) zur Fällung gebracht. Die gefällte DNA wurde mit einem Glashaken gefischt und in 1ml 76% Äthanol, 0,2M Natriumacetat für ca. 20min bei Raumtemperatur gewaschen. Anschließend erfolgte ein weiterer Waschschrift für 1min in 76% Äthanol, 10mM Ammoniumacetat. Nach einem letzten Waschschrift in 1ml 70% Äthanol für 1min bei Raumtemperatur wurde die DNA im Exsikkator getrocknet und anschließend in 500µl 1mM Tris pH 8,0 gelöst.

3.2.3. RNA-Verdau

Zur Inaktivierung der DNA'se in der RNA'se A wurden 50mg RNA'se A in 5ml 0,01M Natriumacetat (pH 5,2) gelöst. Der Ansatz wurde für 15min auf 100°C erhitzt und anschließend langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Nach Zugabe von 1/10 des Volumens 1M Tris (pH 4,0) wurde die RNA'se A aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

Die in 1mM Tris (pH 8,0) gelöste DNA wurde mit RNA'se A (10µg/ml) für 1h bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach Zugabe von 1x Volumen Phenol und kräftigem Schütteln für 5min folgte eine Zentrifugation für 5min bei 4°C und 13.000rpm. Die wässrige Phase wurde abgenommen und mit je 0,5x Volumen Phenol und 0,5x Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) 5min geschüttelt. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde erneut die wässrige Phase abgenommen. Es folgte die Zugabe von 1x Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1). Nach kräftigem Mischen für 5min und einer äquivalenten Zentrifugation wurde die wässrige Phase abgenommen. Das Fällen der in dieser Phase

gelösten DNA erfolgte mit 2x Volumen Äthanol und 1/10 Volumen Natriumacetat (pH 5,2) bei -20°C über Nacht. Anschließend wurde 10min bei 13.000rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet 2x mit 500ml 70% Äthanol gewaschen. Nach jedem Waschschrift folgte eine Zentrifugation für 5min bei 13.000rpm und 4°C. Anschließend wurde das Pellet im Exsikkator getrocknet und dann in 500µl 10mM Tris (pH 8,0) resuspendiert. Die DNA wurde bei -20°C eingefroren und gelagert.

3.2.4. Restriktionsverdau

Der Verdau genomischer DNA erfolgte in einem einfach konzentrierten Reaktionsansatz (10x Restriktionspuffer, Boehringer Mannheim GmbH, Germany) mit 2U Enzym je Mikrogramm eingesetzter DNA über Nacht bei 37°C. Im Anschluss daran wurde die DNA mit 2x Volumen Äthanol und 1/10 Volumen 3M Natriumacetat (pH 5,2) über Nacht bei -20°C gefällt und in 10mM Tris gelöst.

Für den Verdau von Plasmid-DNA wurden 7µl DNA aus einem Plasmid Minipräp. in einem 10µl Reaktionsansatz bestehend aus 1x Puffer (Boehringer Mannheim GmbH, Germany) und 1U Enzym für 1h bei 37°C verdaut.

Zur Entwicklung von AFLP-Markern wurde Hanf-DNA auf 25ng/µl verdünnt. Verdaut wurden je 250ng DNA in einem 25µl Ansatz bestehend aus 1x Restriktions-/Ligationspuffer (RL), 2,5U *HindIII* und 2,5U *MseI* über Nacht bei 37°C.

3.2.5. PCR (polymerase chain reaction) basierte Methoden

Die Sequenzen und Schmelztemperaturen der in dieser Arbeit verwendeten Primer sind in der Anlage in Tabelle A2 aufgeführt. Alle PCR-Reaktionen wurden in 1x Puffer (10mM Tris, 1,5-2,0mM MgCl₂, 50mM KCl, pH 8,3; Hybaid, Heidelberg) durchgeführt.

Für die Amplifikation von SCAR (sequence characterized amplified region)-Markern wurden 50ng Hanf-DNA in einem 25µl Ansatz bestehend aus 1x Puffer, 0,25µM Primer universe,

0,25µM Primer reverse, 1U Taq-Polymerase und 0,2mM dNTP's unter den folgenden Bedingungen amplifiziert. Nach einer Denaturierung von 5min bei 94°C folgten 35 Zyklen mit je 1min Denaturierung bei 94°C, 1min Annealing bei 40-57°C und 2min Elongation bei 72°C. Nach einer abschließenden Elongationsphase von 10min bei 72°C wurde die PCR auf 4°C gekühlt.

Zur Erhöhung der Spezifität wurde teilweise ein Touchdown PCR (**Don et al., 1991**) verwendet. Dabei folgten im Anschluss an eine erste Denaturierung für 4min bei 94°C ein Amplifikationszyklus mit 1min Denaturierung bei 94°C, ein Annealingzyklus für 1min bei 60°C und eine Elongationsphase bei 72°C für 90s. In den folgenden sechs PCR-Zyklen wurde die Annealingtemperatur jeweils um 1°C je Zyklus gesenkt. Danach folgten 35 Zyklen mit 1min Denaturierung bei 94°C, 1min Annealing bei 53°C und 90s Elongation bei 72°C. Einer abschließenden Elongation von 5min bei 72°C schloss sich das Abkühlen der PCR auf 4°C an. Diese Touchdown PCR wurde je nach Primerpaar mit unterschiedlichen Startannealingtemperaturen durchgeführt.

Für die Überprüfung der Hopfenmikrosatellitenprimer wurden PCR-Reaktionen, wie für die SCAR-Marker beschrieben, bei Annealingtemperaturen zwischen 40°C und 60°C durchgeführt. Als Primer fanden die zwei Hopfenmikrosatelliten 11A59 und 7A82 (**Brady et al., 1996**) Verwendung. Eine abschließende Elongation erfolgte hier für 5min bei 72°C. Danach wurde die PCR auf 4°C abgekühlt.

Die AFLP-Prozedur erfolgte nach **Vos et al. (1995)** mit folgenden Modifikationen: zur mit *HindIII* und *MseI* verdauten DNA wurden 5µl eines Ligationsansatzes bestehend aus 0,25U T4 DNA Ligase (Boehringer, Mannheim), 1x RL Puffer, 1,2mM ATP, 2,5pmol *HindIII*-Adapter sowie 25pmol *MseI*-Adapter zugegeben. Die Ligation erfolgte für 3,5h bei 37°C. 5µl dieser Ligation wurden in einem 50µl Ansatz bestehend aus Puffer, 0,2mM dATP, je 75ng preselektiver Primer (*HindIII*+A und *MseI*+A bzw. +G) und 5U Taq DNA-Polymerase mit 50µl Paraffinöl überschichtet und in zwanzig Zyklen unter nachfolgenden Bedingungen amplifiziert: 1min Denaturieren bei 94°C, 1min Annealing bei 60°C und 2min Elongation bei 72°C. Nach einer abschließenden Elongationsphase von 10min bei 72°C wurde die PCR auf 4°C gekühlt.

Im Anschluss an die Preamplifikation erfolgte eine Amplifikation mit Primern mit je 3

selektiven Basen. Dazu wurde die preselektive Amplifikation 1:20 mit H₂O (5µl Preamplifikation und 95µl H₂O) verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden 2,5µl in einem 20µl-Ansatz bestehend aus Puffer, 10ng *Hind*III+ANN (Cy5 markiert), 60ng *Mse*I+ANN (bzw. *Mse*I+GNN), 0,1U Taq DNA-Polymerase und 0,2mM dNTP's mit 25µl Paraffinöl überschichtet und unter nachfolgenden Bedingungen amplifiziert. Nach einer Denaturierungsphase für 1min bei 94°C folgten das Anlagern der Primer für 1min bei 65°C und eine Elongation für 90s bei 72°C. In den folgenden neun Zyklen wurde die Annealingtemperatur um 1°C/Zyklus gesenkt. Danach folgten 23 Zyklen mit einer Denaturierungsphase für 1min bei 94°C, einem Annealingsschritt für 1min bei 56°C und einer Elongation für 1min bei 72°C. Zum Schluss wurde die PCR auf 4°C abgekühlt. Der schematische Ablauf der AFLP-Prozedur ist in Abbildung 3 dargestellt.

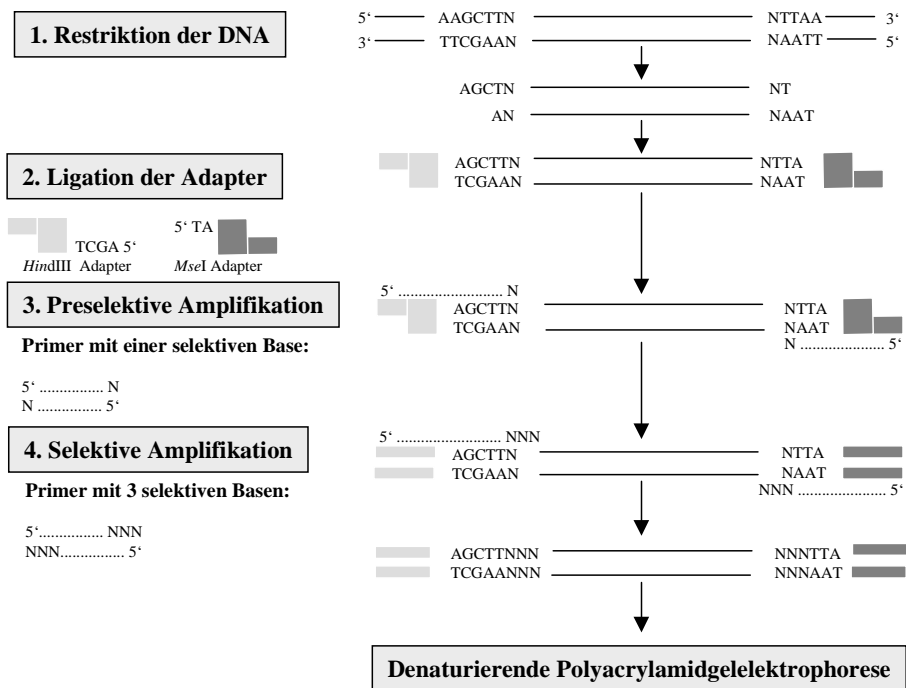


Abbildung 3: Erstellung von AFLP-Markern

Abbildung 3 zeigt schematisch den Ablauf bei der Entwicklung von AFLP-Markern. Die einzelnen Arbeitsschritte werden in den einzelnen Abschnitten näher beschrieben.

Zur Reamplifikation von DNA, isoliert aus einem AFLP-Gel, wurden 2,5µl Eluat in einem 20µl Ansatz bestehend aus Puffer, 10ng *HindIII*+ANN, 60ng *MseI*+ANN und 0,2mM dNTP's mit Öl überschichtet und unter den Bedingungen einer selektiven Amplifikation amplifiziert. Für die Klonierung wurde das Eluat mit dem preselective Primer *HindIII*+A reamplifiziert. Die Elution der DNA-Fragmente ist in 3.2.8. beschrieben.

3.2.6. Elektrophorese

Zur Durchführung einer denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden 3µl einer entsprechenden Amplifikation mit 3µl AFLP-Filler für 90s bei 90°C denaturiert und auf ein 0,3 bzw. 0,5mm starkes PAA-Gel (7M Urea, 6% PAA, 1x TBE) aufgetragen. Die elektrophoretische Trennung erfolgte auf einem ALFexpress™ DNA Sequencer (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) für 540min bei 1500V, 38mA, 34W, 50°C und einem Sampling von 2s. Als Laufpuffer wurde 0,5x TBE verwendet.

Die Auswertung dieser Gele erfolgte mit den Software-Programmen ALFwin™ Version 1.00, ALFwin™ Sequence Analyser 2.00 bzw. ALFwin™ Fragment Analyser 1.01 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg).

Die nichtdenaturierende Gelelektrophorese wurde mit 1mm starken Gelen (5% PAA, 1x TBE-Puffer) in einer PROTEAN™ II Slab Cell-Elektrophoresekammer (BioRad Laboratories GmbH, München) bei 80V und 4°C über Nacht durchgeführt. Als Laufpuffer wurde 0,5x TBE verwendet. Die Auswertung dieser Gele erfolgte wie bei **Yap and McGee (1992)** beschrieben durch Färbung mit Ethidiumbromid. Dazu wurde das Gel für 30min in 0,5mg Ethidiumbromid/l 1x TAE-Puffer geschüttelt und anschließend unter UV-Licht auf einem Transilluminator analysiert.

Für die Agarosegelelektrophorese wurden Gele mit 0,8-2% Agarose, 1x TAE und 0,5µg/ml Ethidiumbromid verwendet. Das Auftrennen von DNA-Fragmenten erfolgte in 1-16h bei 25-80V in 1x TAE-Puffer. Die Auswertung dieser Gele erfolgte unter UV-Licht auf einem Transilluminator.

3.2.7. Isolierung spezifischer Fragmente aus AFLP-Gelen

Für die Isolierung von spezifischen Fragmenten aus AFLP-Gelen wurden diese wie folgt vorbereitet. Beide Glasplatten wurden mit 0,1mM NaOH gereinigt. Nach einer Inkubation von 10min folgten ein gründliches Entfernen der NaOH mit sterilem H₂O sowie eine weitere Behandlung mit 70% Äthanol. Danach wurde eine der beiden Platten ganzflächig mit einem 4:1 Gemisch, bestehend aus einem Bindsilan-Äthanol-Gemisch (siehe 3.1.3.) und 10% Essigsäure, eingerieben. Das Gießen des Gels erfolgte wie unter 3.2.6. beschrieben.

Auf dieses Gel wurden die PCR-Produkte (ausgewählter Primerkombinationen) einer männlichen und einer weiblichen Pflanze in sechsfacher Wiederholung (siehe Abbildung 4) aufgetragen.

Mit dem Erscheinen der gewünschten Bande auf dem Monitor wurde der Lauf des Gels unterbrochen und die Position des Lasers auf der mit Bindsilan behandelten Platte markiert. Danach wurden 2mm breite Bereiche im Abstand von 0-8mm unterhalb des Lasers angezeichnet (siehe Abbildung 4). Die andere Platte wurde vorsichtig entfernt, um das Gel nicht zu beschädigen. Das Gel wurde an den markierten Linien mittels Skalpell durchtrennt, die einzelnen Gelstücke mit einem Spatel abgehoben und in separate Eppendorfgefäße eingewogen.

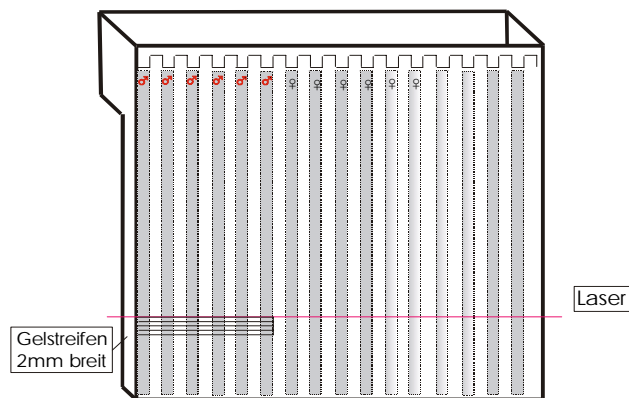


Abbildung 4: Isolierung spezifischer Fragmente aus einem AFLP-Gel

In Abbildung 4 ist das Ausschneiden der Gelstreifen dargestellt. Auf der linken Seite sind die PCR-Produkte der männlichen Hanfpflanze aufgetragen. Daneben zum Vergleich die Produkte der weiblichen Pflanze. Die Position des Lasers ist rot markiert.

3.2.8. Elution von DNA

Die Elution von DNA aus einem Polyacrylamidgel erfolgte mit dem QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN GmbH, Hilden). Dazu wurden Stücke mit dem zu eluierenden DNA-Bereich aus dem Gel ausgeschnitten und in 2x Volumen Diffusionspuffer (200µl/100mg Gel) für 30min bei 50°C inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation für 1min bei 14.000rpm. Der Überstand wurde mittels Pipette abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Nach Zugabe von 3x Volumen Puffer QX1, 10µl QIAEX II und 10µl Natriumacetat (pH5,2) erfolgte unter gelegentlichem Mischen eine Inkubation für 10min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde 30s bei 14.000rpm zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Überstandes folgten zwei Waschschrte in je 500µl Puffer PE. Einer folgenden Zentrifugation für 30s bei 14.000rpm schloss sich ein Trocknen des Pellets für ca. 25min bis zur Weißfärbung an. Durch Zugabe von 20µl Puffer EB (Elution Buffer) wurde das Pellet resuspendiert und für 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation für 30s bei 14.000rpm. Der Überstand mit der darin gelösten DNA wurde vorsichtig mit der Pipette abgezogen. Für die Elution von DNA aus einem Agarosegel wurde die DNA elektrophoretisch aufgetrennt und die interessierenden Bereiche mit einem Skalpell ausgeschnitten. Anschließend erfolgte die Elution der DNA aus den Gelstücken mittels QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN GmbH, Hilden) wie in der Anleitung beschrieben oder mittels Biotraps (Schleicher & Schuell, Dassel). Dazu wurden die Gelstücke in die Biotraps geladen und die DNA für 2h in 1x TAE bei 150V durch eine semipermeable Membran eluiert. Anschließend wurde die DNA mit 1/10 Volumen 3M Natriumacetat (pH 5,2) und 2x Volumen Äthanol über Nacht bei -20°C gefällt. Nach Pelletierung für 10min bei 13.000rpm und 4°C und einem Waschschrte mit 70% Äthanol wurde die DNA kurz getrocknet und in 10µl H₂O gelöst.

3.2.9. Klonierung von DNA

Für die Klonierung von *AluI*-restringierter Hanf-DNA wurden 1µl DNA in einem 10µl Ansatz bestehend aus 1x Ligationspuffer (Gibco BRL, Life Technologies, Karlsruhe) und 1U Ligase (Gibco BRL) mit 1µl (51ng/µl) des mit *EcoRV* vorbereiteten Vektors pBluescript SK⁻ ligiert. Die Ligation erfolgte für 1h bei Raumtemperatur und 1h bei 37°C.

Zur Transformation des Ligationsansatzes in Bakterien des Stammes *E. coli* Dh10B wurden zunächst elektrokompente Zellen hergestellt. Dazu wurden 5ml SOB Medium mit einer Bakterieneinzelkolonie angeimpft. Das Wachstum der Bakterien erfolgte bei 37°C und 250rpm über Nacht. Die Bakterien wurden in 500ml SOB Medium überführt und unter äquivalenten Bedingungen bis zu einer OD_{600nm} von 1 angezogen. Nach Sedimentation der Zellen für 15min bei 4.500rpm und 4°C folgte ein zweimaliges Waschen mit 500ml 10% Glycerin. Anschließend wurden die Zellen unter gleichen Bedingungen abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in der verbliebenen Restflüssigkeit resuspendiert. Für die Bestimmung der OD_{550nm} wurde eine 1:300 Verdünnung der Zellen mit 10% Glycerin verwendet. Anschließend wurden das Volumen der Zellen so eingestellt, das die optische Dichte von 1ml elektrokompenter Zellen bei 550nm in einem Bereich zwischen 250 und 300 liegt. Die Zellen wurden in Aliquots von 200µl in einem -80°C kalten Metallblock schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

Für eine Transformation wurden 40µl elektrokompente Zellen des Laborstammes Dh10B mit 1µl des Ligationsmixes vorsichtig gemischt. Die Transformation erfolgte mit einem *E. coli* pulser (BioRad Laboratories GmbH, München) bei 2,5kV, 25µF und 200Ω. Nach Zugabe von 1ml SOC-Medium folgte eine Erholungsphase für 1h bei 37°C. Im Anschluss daran wurden die Bakterien auf Selektionsmedium ausgestrichen. Nach dem Wachstum über Nacht bei 37°C wurden Einzelkolonien in 384er Platten (Nunc, Wiesbaden) mit je 75µl FB-Medium je Well gepickt und diese für 16-18h bei 37°C inkubiert.

Die Klonierung von PCR-Fragmenten erfolgte mit dem TOPO TA Cloning[®]-Kit (Invitrogen, Groningen). Für die Ligation wurden 4µl PCR-Produkt, 1µl Salzlösung und 1µl Vektor pCR[®]2.1-TOPO[®] sanft gemischt, 5min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf Eis gekühlt. 2µl dieser Ligation wurden in One Shot[™] Zellen transformiert. Dazu wurden

Ligation und Zellen kurz gemischt und 30min auf Eis inkubiert. Nach einem sich anschließenden Hitzeschock für 30s bei 42°C wurden die Zellen für 2min auf Eis abgekühlt. Es folgten die Zugabe von 250µl SOC und eine Erholungsphase von 1h bei 37°C. Je 50-200µl jeder Transformation wurden auf Selektionsmedium ausplattiert und über Nacht bei 37°C angezogen.

3.2.10. Dauerkulturen

Bakterieneinzelkolonien wurden mit einem sterilen Zahnstocher gepickt, in jeweils 2ml LB-Medium (+ entsprechende Antibiotika) überführt und über Nacht bei 37°C und 125rpm angezogen. 0,85ml dieser Kulturen wurden mit 0,15ml Glycerin in ein 1,5ml Eppendorfgefäß überführt, auf einem Vortexgerät gemixt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.2.11. Mini-Präparation

Einzelkolonien wurden in 2ml LB-Medium (+ 50-100µg/ml Antibiotika) über Nacht bei 37°C und 125rpm angezogen. Die Zellen von 1,5ml dieser Kultur wurden für 2min bei 13.000rpm pelletiert und nach Verwerfen des Überstandes in 100µl Lösung I resuspendiert. Die Lyse erfolgte während einer Inkubation für 5min auf Eis. Nach Zugabe von 200µl Lösung II folgte ein sanftes Mischen. Im Anschluss an die Zugabe von 150µl Lösung III schlossen sich eine Inkubationsphase für 5min auf Eis sowie eine Zentrifugation für 5min bei 10.000rpm an. Die sich im Überstand befindende Plasmid-DNA wurde mit 1ml Äthanol (-20°C) für 20min bei -20°C gefällt. Die DNA wurde mittels Zentrifugation für 5min bei 13.000rpm pelletiert und mit 500µl 70% Äthanol gewaschen. Nach einem kurzen Trocknen für ca. 5min im Exsikkator wurde das Pellet in 40µl 1x TE/RNA'se (10µg/ml RNA'se) aufgenommen und bei 37°C für 15min inkubiert.

3.2.12. DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte mit dem ALFexpress™ AutoRead™ Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) entsprechend der Anleitung.

6µl jeder Sequenzierungsreaktion wurden auf ein denaturierendes Polyacrylamidgel (siehe 3.2.6.) aufgetragen und analysiert.

3.2.13. Blotten von DNA

2-10µg restringierte DNA wurde auf einem Agarosegel aufgetrennt und mittels Southern Blot (**Southern, 1975**) auf eine Hybond-N⁺ Membran (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) transferiert. Nach einer Laufzeit von ca. 16 Stunden wurde der Blot abgebrochen und die Membran 2min mit 2x SSC gewaschen. Das Fixieren der DNA auf der Filteroberfläche erfolgte entweder durch eine UV-Behandlung bei 254nm für 15min oder durch Hitzebehandlung für 1 Stunde bei 80°C.

Zur Überprüfung der Markierungseffizienz DIG-markierter DNA-Sonden wurden je 2,5pmol, 50fmol, 10fmol, 2fmol, 0,4fmol und 0,08fmol markierte Sonde mittels Dot Blot auf eine Hybond-N⁺ Membran (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) transferiert. Diese wurde 1 Stunde bei 80°C gebacken, detektiert und entwickelt. Anschließend fand eine Auswertung aufgrund der Signalstärken statt.

3.2.14. Blotten von Bakterienkolonien

Die Bakterienkolonien wurden mit einem 384er Stempel (Nunc, Wiesbaden) auf eine Hybond- N⁺ Nylonmembran (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) gestempelt. Um Hybridisierungsartefakte auszuschließen, wurde auf die gleiche Membran in diagonaler Anordnung ein zweites Mal gestempelt. Im Anschluss wurden die Filter zum Wachsen der Bakterien auf LB-Platten gelegt. Nach einer Wachstumsphase bei 37°C über Nacht erfolgte

die Lyse der Bakterien auf einem mit 10% SDS getränktem Whatmanfilter (Whatman Laboratory Division, Maidstone, England) für 3min. Anschließend wurde für 3min auf einem mit Denaturierungspuffer getränktem Whatmanfilter denaturiert. Es folgten zwei Neutralisierungsschritte für je 3min auf einem mit Neutralisierungspuffer getränktem Filterpapier. Danach wurde mit 2xSSC gewaschen. Nach dem Backen für 1h bei 80°C wurden die Membranen unter sterilen Bedingungen bei Raumtemperatur gelagert.

Nach Inkubation mit je 1ml (1mg/ml) Proteinase K für 1h bei 37°C wurde die Bakterienmembran zwischen zwei mit H₂O getränkten Whatmanfiltern platziert. Durch Überrollen der Filter mit einer Glasflasche wurde das Whatmanpapier unter leichtem Druck auf die Bakterienfilter gepresst. Beim Entfernen der oberen Lage Whatmanfilter blieben die Proteine daran kleben und wurden somit von den Filtern entfernt. Dieser Schritt wurde mehrfach wiederholt. Anschließend wurden die Filter mit der daran haftenden Plasmid-DNA mit 2x SSC in Folie eingeschweißt.

3.2.15. Hybridisierung von Nylonmembranen

Nach einer Vorhybridisierung der Membran für 1h bei 37-60°C in DIG-Hybridisierungspuffer erfolgte die Hybridisierung im gleichen Puffer unter äquivalenten Bedingungen mit einer DIG-markierten Sonde (6,4pmol/ml-10pmol/ml) über Nacht. Die Markierung der DNA-Proben mit Digoxigenin erfolgte nach **Ross et al. (1999)**.

Die Hybridisierung erfolgte mit 1ml Hybridisierungslösung/100cm² Membran nach der "Sandwich"-Methode (**Fladung und Rai Ahuja, 1995**) bzw. mit 15ml Hybridisierungslösung in Glasflaschen oder Plastiktaschen (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim). Das Label wurde anschließend in Falcons abgefüllt und bei -20°C verwahrt.

Zur Detektion DIG-markierter Signale wurden hybridisierte Membranen zweimal für 5min mit 2x SSC, 0,5% SDS bei Raumtemperatur gewaschen. Anschließend folgten zwei weitere Waschungen für jeweils 15min mit 0,5x SSC, 0,5% SDS bei 65°C. Nach dem Entfernen der Pufferreste mit DIG-Waschpuffer wurden die Filter in 1x Blocking Stock Solution für 30min bei Raumtemperatur equilibriert. Danach folgten die Zugabe von Anti DIG-AP im Verhältnis

5000:1 und eine Inkubationsphase für 30min bei Raumtemperatur. Zum Entfernen nicht-gebundener Antikörper wurde zweimal mit DIG-Waschpuffer für je 15min gewaschen. Die Membran wurde für 5min in Detektionspuffer equilibriert und anschließend für 5min mit jeweils 500 μ l CSPD:Detektionspuffer = 1:100 in einer Folie inkubiert. Nach dem Einschweißen in eine neue Folie und Inkubation für 15min bei 37°C wurden die Filter zur Exposition auf Lumi Nonradioactive Detection Filme (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim) aufgelegt. Die Filme wurden nach 6-16h in Entwickler (Ilford Phenisol, Tetenal Photowerk, Norderstedt) ca. 5min entwickelt und anschließend mit Fixierer (Tetenal Superfix, Tetenal Photowerk, Norderstedt) ca. 6-8min fixiert.

Um gleiche Membranen mehrmals hintereinander hybridisieren zu können, wurden die Sonden durch Strippen wieder entfernt. Dazu wurde die Membran 2min mit H₂O bei Raumtemperatur gewaschen. Anschließend erfolgte der Strippvorgang für 2x 15min mit Stripppuffer bei 37°C. Das Abwaschen der Pufferreste wurde in 5x SSC für 5min bei Raumtemperatur und unter ständigem Schütteln durchgeführt. Im Anschluss wurden die Filter mit 2x SSC in Folie eingeschweißt und bei 4°C gelagert.

3.2.16. Erstellung der genetischen Karte

Zur Erstellung der Kopplungskarte wurden 80 F₁-Nachkommen (A2/1-A2/100 außer A2/71) der Kreuzung CAN18/1 x CAN18/2 verwendet.

In einem ersten Schritt wurden alle Marker (AFLP, STS und SCAR) erfasst, welche innerhalb der Kartierungspopulation Polymorphismen zeigten. Diese wurden im Anschluss in einer binären (0/1) Matrix zusammengestellt. Dabei stehen die 0 für die Abwesenheit und die 1 für das Vorhandensein des Markers bei der jeweils analysierten Pflanze.

Im Anschluss wurden anhand dieser Daten die Spaltungsverhältnisse für die einzelnen Marker mit dem Programm Joinmap Single Locus Analysis (2.0) errechnet und mittels χ^2 -Test auf Signifikanz geprüft. Dabei wird für dominante Marker in Abhängigkeit von der Ausgangssituation der Eltern ein Spaltungsverhältnis von 3:1 oder 1:1 erwartet (**Schumacher et al., 1997**). Diese Verhältnisse entsprechen der F₂-Situation (beide Eltern heterozygot) und

der Rückkreuzungssituation (ein Elter heterozygot, der andere ohne Bande). Marker, die nicht eindeutig einem der beiden Spaltungsverhältnisse zuzuordnen waren, wurden sowohl als 1:1 als auch als 3:1 spaltend behandelt.

Die anschließende Kartierung erfolgte mit dem Programm Joinmap 1.3 (**Stam, 1993**) bei einem kritischen LOD-Wert (Likelihood Odds Ratio) von 4,0. Der LOD-Wert ist definiert als $\log_{10} L/L_0$. Dabei ist L die Wahrscheinlichkeit dafür, dass zwei Marker gekoppelt sind. L_0 ist die Wahrscheinlichkeit dafür, dass keine Kopplung vorliegt. Die graphische Darstellung der Kopplungsgruppen erfolgte mit dem Programm Draw Map. Die einzelnen Kopplungsgruppen wurden in das Programm Corel Draw 8.0 (Corel Corporation, Unterschleissheim) übertragen und zu einer Karte zusammengestellt.