

Aus dem Institut für Pflanzenzüchtung und Pflanzenschutz
Der Landwirtschaftlichen Fakultät
der
Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg



“*In situ* Hybridisierung an Hanf (*Cannabis sativa* L.) Chromosomen”

als
Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor agriculturarum (Dr. agr.)

vorgelegt von

Diplomagraringenieur
Marko Riedel

Halle/Saale 2005

urn:nbn:de:gbv:3-000009884

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000009884>]

Aus dem Institut für Pflanzenzüchtung und Pflanzenschutz
Der Landwirtschaftlichen Fakultät
der
Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg



“*In situ* Hybridisierung an Hanf (*Cannabis sativa* L.) Chromosomen”

als
Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor agriculturarum (Dr. agr.)

vorgelegt von

Diplomagraringenieur

Marko Riedel

geb. am 01.12.1973

in Lutherstadt Wittenberg

Gutachter: Prof. Dr. habil W. E. Weber
Prof. Dr. habil W. Diepenbrock
Dr. habil V. Schubert

Verteidigung am: 29.11.2005

Halle / Saale 2005

urn:nbn:de:gbv:3-000009884

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000009884>]

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Stand des Wissens	3
2.1	Grundlagen der Geschlechtsbestimmung	3
2.1.1	Geschlechtsbestimmungsmechanismen allgemein	3
2.1.1.1	Entwicklung der Geschlechtschromosomen	4
2.1.2	Geschlechtsbestimmung bei Pflanzen	6
2.1.2.1	Sexuell monomorphe Pflanzen	7
2.1.2.2	Sexuell polymorphe Pflanzen	9
2.2	Hanf	11
2.2.1	Botanik	11
2.2.2	Cytologie	13
2.2.3	Molekulargenetik	14
2	Material und Methoden	15
2.1	Material	15
2.1.1	Pflanzenmaterial	15
2.1.2	Bakterien und Vektoren	15
2.2	Methoden	15
2.2.1	DNA-Isolierung	15
2.2.1.1	Pflanzliche Gesamt-DNA	15
2.2.1.2	Bakterien Plasmid-DNA (Plasmid Mini-Prep.)	15
2.2.2	Hanfpollenisolierung	16
2.2.3	Polymerase Kettenreaktion (PCR) basierende Methoden	16
2.2.3.1	Standard PCR	16
2.2.3.2	RAPD (random amplified polymorphic DNA)	17
2.2.3.3	DOP-PCR (degenerated oligonucleotid primed-PCR)	17
2.2.3.4	I-PEP-PCR (improved primer extension preamplification-PCR)	17
2.2.3.5	PCR Walking	18
2.2.3.6	AFLP (amplified fragment length polymorphism)	19
2.2.3.7	Touchdown-PCR	20
2.2.4	DNA-Sequenzierung	20
2.2.5	Elektrophorese	21
2.2.6	Fragmentisolierung aus Elektrophoresegelen	21
2.2.7	Klonierung von DNA-Fragmenten	21
2.2.8	Bakterielle Dauerkulturen	22

Inhaltsverzeichnis

2.2.9	Sondenherstellung	22
2.2.10	Southern Blot	23
2.2.11	Blotten von Bakterienkolonien	23
2.2.12	DNA-DNA Hybridisierung	24
2.2.13	Chomosomenpräparation	24
2.2.14	FISH (Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung)	25
3	Ergebnisse	28
3.1	Entwicklung männlich-spezifischer SCAR-Marker	28
3.1.1	Isolierung von männlich-spezifischen PCR-Fragmenten	28
3.1.2	Sequenzierung der Klone und Herstellung sequenzspezifischer Primer	29
3.1.3	Test der SCAR-Primer an männlichen und weiblichen Hanfpflanzen	31
3.2	Entwicklung PAR-spezifischer SCAR-Marker	32
3.2.1	Sequenzierung der Klone und Herstellung sequenzspezifischer Primer	34
3.2.2	Test der SCAR-Primer an Hanfpflanzen	37
3.3	Differenzielles Screening einer Hanf-DNA-Bank nach repetitiven geschlechtsspezifischen Klonen	41
3.4	Amplifikation von Pollen-DNA mit degenerierten Primern	43
3.5	PCR Walking	45
3.6	Southern-Blot Analyse	47
3.6.1	Southern-Blot Analyse geschlechtsspezifischer Fragmente	48
3.6.2	Southern-Blot Analyse PAR-spezifischer Fragmente	48
3.7	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH)	53
3.7.1	Chromosomenpräparation für die FISH	53
3.7.2	Etablierung der Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung bei Hanf	54
3.7.3	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung mit geschlechtsspezifischen Sonden	55
3.7.4	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung mit PAR-spezifischen Sonden	56
4	Diskussion	64
4.1	Entwicklung geschlechtsspezifischer Sonden	64
4.1.1	Entwicklung von geschlechts- und PAR-spezifischen SCAR-Markern	64
4.1.1.1	Konvertierung von geschlechtsspezifischen RAPD-Markern in SCAR-Marker	66
4.1.1.2	Konvertierung von PAR-spezifischen AFLP-Markern in SCAR-Marker	67
4.1.2	Southern-Blot Analyse molekularer Marker	70
4.1.3	Screening von DNA-Banken nach geschlechtsspezifischen Klonen	74
4.2	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH)	77

Inhaltsverzeichnis

4.2.1	Etablierung der FISH bei Hanf	78
4.2.2	FISH mit geschlechtsspezifischen Sonden	81
4.2.3	FISH mit PAR-spezifischen Sonden	84
5	Zusammenfassung	86
6	Literaturverzeichnis	88
7	Anhang	103
	Abbildungsverzeichnis	103
	Tabellenverzeichnis	104
	Tabellen	105
	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	109