

7 Anhang

Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1.1: ABC Modell der Steuerung der Blütenorganidentität	7
Abbildung 3.1: Isolierung und Klonierung des RAPD-Markers OPC11 ₂₇₀₀	27
Abbildung 3.2: Blastx Vergleich der Sequenz des RAPD-Fragmentes OPC-11 ₂₇₀₀	28
Abbildung 3.3: Sequenz der beiden Enden des Fragmentes OPC-11 ₂₇₀₀	29
Abbildung 3.4: Test geschlechtsspezifischer Primerpaare.....	30
Abbildung 3.5: Test des männlich-spezifischen SCAR-Primers C11Seq_L + C11Komp_R an 74 Einzelpflanzen der Population A2.....	31
Abbildung 3.6: AFLP-Gel mit dem Marker AGA_AAT_330.....	32
Abbildung 3.7: Überprüfung der Klone des Fragmentes AGA_AAT_330.....	32
Abbildung 3.8: Konsensussequenz des Fragmentes AGA_AAT_330.....	34
Abbildung 3.9: Sequenz der Klone AGA_GAA_510_B3 und AGA_GAA_510_B9.....	35
Abbildung 3.10: Test geschlechtsspezifischer Primerpaare.....	36
Abbildung 3.11: Test des PAR-spezifischen SCAR-Primers AAT330Komp an 74 Einzelpflanzen der Population A2.....	38
Abbildung 3.12: Test des PAR-spezifischen SCAR-Primers AAT330CA an 74 Einzelpflanzen der Population A2.....	39
Abbildung 3.13: Screening der Hanf-DNA-Bank.....	40
Abbildung 3.14: Dot-Blot Hybridisierung.....	42
Abbildung 3.15: Amplifikation von Pollen-DNA mittels I-PEP PCR.....	43
Abbildung 3.16: Test der I-PEP Amplifikate mit männlich-spezifischem Primer SCAR _{OPA08}	43
Abbildung 3.17: Schematische Darstellung des PCR Walkings.....	45
Abbildung 3.18: PCR Walking PCR I.....	45
Abbildung 3.19: PCR Walking PCR II.....	46
Abbildung 3.20: Southern-Blot Analyse geschlechtsspezifischer Fragmente.....	50
Abbildung 3.21: Southern-Blot Analyse PAR-spezifischer Fragmente.....	51
Abbildung 3.22: Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH) mit rDNA-Sonden.....	53
Abbildung 3.23: FISH mit geschlechtsspezifischer Sonde SCAR _{OPA08}	57
Abbildung 3.24: FISH mit geschlechtsspezifischer Sonde C11Komp.....	58
Abbildung 3.25: FISH mit geschlechtsspezifischer Sonde C11Seq.....	59
Abbildung 3.26: FISH mit geschlechtsspezifischer Sonde C11Seq.....	60

Abbildung 3.27: FISH mit PAR-spezifischer Sonde AAT_330Komp.....	61
Abbildung 3.28: FISH mit PAR-spezifischer Sonden 330GW_L und 330GW_R.....	62

Tabellenverzeichnis:

Tabelle 3.2	Insertgrößen und Geschlecht selektierter Klone der Hanf-DNA-Bank.....	41
Tabelle 3.3:	Als Sonden für die Southern-Blot Hybridisierung eingesetzte DNA Fragmente, deren Größe, Geschlecht, Herkunft und Markierungsmethoden.....	49
Tabelle 3.4:	Southern-Blot Analyse mit geschlechtsspezifischen Sonden. Größen der detektierten Hybridisierungssignale. Mit einem Stern gekennzeichnete Signale zeigen geschlechtsabhängige Unterschiede.....	49
Tabelle 7.1:	Geschlechts- und Markerdaten der 74 Pflanzen der Population A2 (die Reihenfolge der Pflanzen entspricht der Anordnung in den Abbildungen 3.5 , 3.11 und 3.12).....	106
Tabelle 7.2:	Sequenzen verwendeter Primer und Adapter.....	108
Tabelle 7.3	Chemikalien und Lösungen.....	109

Tabelle 7.1: Geschlechts- und Markerdaten der 74 Pflanzen der Population A2 (die Reihenfolge der Pflanzen entspricht der Anordnung in den Abbildungen 3.5, 3.11 und 3.12)

Nr.	Pflanze	Geschlecht	AFLP-Marker	SCAR-Marker		
			AAT330	C11Seq	330Komp	330CA
1	A2/1	♀				1
2	A2/2	♀				1
3	A2/4	♀	1		1	
4	A2/5	♀				1
5	A2/6	♀				1
6	A2/9	♂	1	1	1	
7	A2/11	♂	1	1	1	
8	A2/12	♂	1	1	1	
9	A2/14	♀				1
10	A2/15	♀				1
11	A2/16	♂	1	1	1	
12	A2/17	♀	1		1	
13	A2/19	♀	1		1	
14	A2/20	♀				1
15	A2/22	♀	1		1	
16	A2/23	♀				1
17	A2/24	♀	1		1	
18	A2/25	♀				1
19	A2/26	♀				1
20	A2/27	♂		1		1
21	A2/28	♂	1	1	1	
22	A2/29	♂		1		1
23	A2/30	♀	1		1	
24	A2/31	♀				1
25	A2/32	♀				1
26	A2/33	♀				1
27	A2/34	♀	1		1	
28	A2/35	♀				1
29	A2/36	♀				1
30	A2/37	♂	1	1	1	
31	A2/38 *	♂	1			
32	A2/39	♂		1		1
33	A2/40	♀				1
34	A2/41	♂		1		1
35	A2/42	♀				1
36	A2/43	♀	1		1	
37	A2/44	♀	1		1	
38	A2/45	♀				1

Fortsetzung Tabelle 7.1:

Nr.	Pflanze	Geschlecht	AFLP-Marker	SCAR-Marker		
			AAT330	C11Seq	330Komp	330CA
39	A2/46	♂		1		1
40	A2/47	♂	1	1	1	
41	A2/49	♂	1	1	1	
42	A2/50	♂	1	1	1	
43	A2/51	♂	1	1	1	
44	A2/55	♀				1
45	A2/54	♂	1	1	1	
46	A2/57	♀				1
47	A2/59	♂	1	1	1	
48	A2/61	♀				
49	A2/63	♀				1
50	A2/65	♂	1	1	1	
51	A2/66	♀				1
52	A2/67	♀				1
53	A2/68	♀				1
54	A2/70	♀				1
55	A2/71**	♀			1	
56	A2/72	♂	1	1	1	
57	A2/73	♂	1	1	1	
58	A2/74	♂		1		1
59	A2/75	♂	1	1	1	
60	A2/76	♀				1
61	A2/77	♀				1
62	A2/78	♂	1	1	1	
63	A2/79	♀				
64	A2/80	♂	1	1	1	
65	A2/81	♂	1	1	1	
66	A2/82	♂	1	1	1	
67	A2/84	♀	1		1	
68	A2/85	♂	1	1	1	
69	A2/87	♀				1
70	A2/88	♀				1
71	A2/91	♂	1	1	1	
72	A2/98	♀				1
73	A2/99	♀				1
74	A2/100	♂		1		1

A2/38* kein SCAR-Amplifikationsprodukt erzeugbar (DNA Degradierung)

A2/71** für diese Pflanze waren keine AFLP-Daten verfügbar

Tabelle 7.2: Sequenzen verwendeter Primer und Adapter

RAPD-Primer	
OPC-11	5´-AAA GCT GCG G-3´
OPE-11	5´-GAG TAT CAG G-3´
AFLP-Primer	
<i>Mse</i> I+AAT	5´-GAT GAG TCC TGA GTA AAA T-3´
<i>Mse</i> I+GAA	5´-GAT GAG TCC TGA GTA AGA A-3´
<i>Hind</i> III+A	5´-GAC TGC GTA CCA GCT TA-3´
<i>Hind</i> III+AGA	5´-*GAC TGC GTA CCA GCT TAG A-3´
SCAR-Primer	
C11Komp_L	5´-CGT GGA AGC TTC AGT CAA CC-3´
C11Seq_L	5´-CAA GTA TAT TGC AGT CGC GG-3´
C11Komp_R	5´-AGA CTT CCG AGC GTA AG-3´
AAT330Komp_L	5´-TTA AAA TAC AGA TTG TGT CGT GTT ATG-3´
AAT330Komp_R	5´-CAA CCC GTA TTT TAT GAG AGA TTC GAA-3´
AAT330CA_L	5´-AAA GTA TGC TCG GAC CCA GA-3´
AAT330CA_R	5´-ACC CCG TAT TTT ATG AGA GAT TCG-3´
GAA510_B3_L	5´-TAA AGA ACA GAG GAT GGC ATG-3´
GAA510_B3_R	5´-AAG CTT AGA GGA GCA CGT ATG-3´
GAA510_B9_L	5´-TAA AGA ACA TTC TAA TCT CAC T-3´
GAA510_B9_R	5´-AAG CTT AGA CCA ACT GAT CAA-3´
PCR Walking Primer	
AP1	5´-GTA ATA CGA ATA ACT ATA GGG C-3´
AP2	5´-ACT ATA GGG CAC GCG TGG T-3´
330_iL1	5´-GAA GGC CCA CAT GAA GAC ATG GAA AAG-3´
330_iL2	5´-TCA ATC AAA CCA ACA ATC GTC GAA AGG-3´
330_iR1	5´-CTT TTC CAT GTC TTC ATG TGG GCC TTC-3´
330_iR2	5´-CCG CAT TGT GTT TGT CTT CTA TCT TGC-3´
PCR Walking Adapter	
ADAP1	5´-GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CAC GCG TGG TCG ACG GCC CGG GCT GGT-3´
ADAP2	5´-3ACCAGCCC[3AC7]-3´

* Endmarkierung der Primer mit Cy5-Farbstoff

nächste Seite: **Tabelle 7.3** Chemikalien und Lösungen

Lösung	Zusammensetzung
10 x TBE	242,28 g Tris; 102,64 g Borsäure; 7,44 g EDTA auf 2 l aufgefüllt
20 x SSC	0,3 M Natriumcitrat; 3 M Natriumchlorid; pH 7,0
50 x TAE	2M Tris-Acetat; 50 mM EDTA; pH 8,0
Blockierungslösung (FISH)	4 x SSC, 3% BSA und 0,1% Tween 20
1 x Blockierungslösung	10 x Blockierungslösung 1:10 gelöst in Maleinsäurepuffer
10 x Blockierungslösung	10% Blocking Reagenz gelöst in Maleinsäurepuffer
CTAB-Extraktionspuffer	100 mM TRIS, 0,7 M NaCl, 10 mM EDTA, 1% β -Mercaptoethanol
Denaturierungspuffer	0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl
Detektionspuffer	0,1 M Tris-HCl; 0,1 M NaCl, pH 9,5
Detektionspuffer (FISH)	4 x SSC, 1% BSA, 0,1% Tween 20
Hybridisierungspuffer (DIG)	5 x SSC; 0,1% (w/v) Lauroylsarcosine; 0,02% (w/v) SDS; 1% Blocking Reagenz
Hybridisierungspuffer (³² P)	6 x SSC, 5 x Denhardt's Lsg., 0,5% SDS, 20 μ g/ml Heringssperma-DNA
1 x Enzympuffer	40 mM Zitronensäure, 60 mM Natriumcitrat, pH 4,8
3:1 Fixierlösung	98% Ethanol + Eisessig (3:1)
Hybridisierungsmix (FISH)	2 x SSC, 10% Dextransulfat
IPTG	24 mg IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside)/ml
5 x Ladepuffer B	0,25% Bromphenolblau; 40% (w/v) Saccharose
5 x Ladepuffer X	0,25% Xylene Cyanol FF; 40% (w/v) Saccharose
LB-Medium	10 g Bacto-Trypton; 5 g Hefeextrakt; 10 g NaCl; pH 7,0
Ligationspuffer	50 mM TRIS-HCl pH 6,7, 10 mM MgCl ₂ , 0,5 mM ATP, 10 mM Dithioerithitol
Neutralisierungspuffer	1 M Tris; 1,5 M NaCl; pH 7,5
40% PAA 19:1	76 g Polyacrylamid; 4 g N,N'-Methylen-bis-acrylamid; mit dd H ₂ O auf 200 ml aufgefüllt
PAA-Gel	7 M Urea; 6% PAA (19:1); 1 x TBE-Puffer
1 x PBS	0,12 M NaCl, 7 mM Na ₂ HPO ₄ , 3 mM NaH ₂ PO ₄ , 2,7 mM KCl
Plasmidlösung I	50 mM Glucose; 25 mM Tris pH 8,0; 10 mM EDTA pH 8,0; 3 mg/ml Lysozym
Plasmidlösung II	0,2 N NaOH; 1% SDS
Plasmidlösung III	5 M Kaliumacetat; 1,8 M Eisessig
Phenol/Chloroform	Phenol + Chloroform (1:1)
Proteinase K Puffer Stock	20 mM Tris, 20 mM CaCl ₂
1 x RL-Puffer	10 mM Tris/HCl; 10 mM Mg-Acetat; 50 mM K-Acetat; 5 mM DTT; pH 7,5
SOC-Medium	20 g Trypton; 5 g Hefeextrakt; 0,5 g NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl ₂ ; 20 mM Glucose; pH 7,0
Strippingpuffer	0,5 M NaOH; 0,1% SDS
TE-Puffer	10 mM Tris pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0
TE/RNase-Puffer	TE-Puffer, 40 mg/ml RNaseA
X-Gal 2	2,5 mg X-Gal/ml in N'N'-Dimethylformamid lösen

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen:

³² P	radioaktives Phosphorisotop
AFLP	amplified fragment length polymorphisms
ALF	ALFexpress TM DNA Sequencer (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
Amp ₁₀₀	Ampicillin (100mg/ml)
bp	Basenpaar
CAPS	cleaved amplified polymorphic sequences
CSPD	Substrat für Chemilumineszenzreaktion
CTAB	N-Cetyl-N, N, N,-trimethylammoniumbromid
DAPI	4,6 Diamidino-2- phenylindoledihydrochlorid
DIG	Digoxygenin
DNA	dexoxyribonucleic acid
dNTP	desoxyribonucleotide triphosphate
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
FITC	Fluoreszeinthiocyanat
I-PCR	inverse PCR
IPTG	isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
ITS	internal transcribed spacer
kb	Kilobasenpaar
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
Mbp	Megabasenpaar
MROS	male reproductive organ-specific
ORF	open reading frame
PAA	Polyacrylamid
PAR	Pseudo Autosomale Regionen
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Ketten-Reaktion)
RAPD	random amplified polymorphic DNA
RFLP	restriction fragment length polymorphism
RNAse	RNA abbauendes Enzym
rpm	round per minute (Umdrehungen pro Minute)

SCAR	sequence characterized amplified region
SDS	sodium dodecyl sulfate
SSC	sodium chloride-sodium acetate-sodium citrate
SSCP	single strand confirmation polymorphisms
SSR	simple sequence repeats
STR	short tandem repeat
STS	sequence tagged sites
TAE	Tris-acetate-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borsäure-EDTA (Puffer)
TE	Tris-EDT (Puffer)
THC	Delta 9-Tetrahydrocannabinol
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	unit (Einheit)
w/v	weight/volume
Xgal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactoside