

Bachelorarbeit

vorgelegt zur Erlangung des Grades eines Bachelor of Science
an der Fakultät für Biologie und Biotechnologie der Ruhr-Universität Bochum

Entwicklung von Mikrosatelliten-Primern zur Unterscheidung
von *Microbotryum saponariae*-Populationen

Microsatellite primer development for differentiation
of *Microbotryum saponariae* populations

von

Vasco Elbrecht

Angefertigt in der Arbeitsgruppe Geobotanik

Bochum, im Juli 2010

Referent: Prof. Dr. Dominik Begerow

Korreferent: Prof. Dr. Ralph Tollrian

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	<i>Microbotryum saponariae</i> und seine Wirte aus der Gattung <i>Saponaria</i>	1
1.2	Molekulare Methoden	2
1.3	Mikrosatelliten als molekulare Marker	3
1.4	Zielsetzung, Versuchsplanung und Herangehensweise	5
2.	Material und Methoden	6
2.1	Laborbedarf	6
2.2	Sequenz-Datenbank	6
2.3	Entwicklung der Primer: Detaillierte Vorgehensweise (Übersicht)	7
2.3.1	Sequenzvorbereitung mit Sequencher	8
2.3.2	Mikrosatellitensuche in Geneious Pro (mit Phobos und Dotplots)	9
2.3.3	Entwicklung der Primer	9
2.3.4	Testen der Primer	10
2.3.5	Untersuchung von größeren Probenmengen (LI-COR DNA Analyzer)	11
2.3.6	Sequenzieren von Amplifikaten	13
3.	Ergebnisse	14
3.3.1	Sequenzvorbereitung mit Sequencher	14
3.3.2	Suche nach Mikrosatelliten in Geneious Pro (mit Phobos und Dotplots)	15
3.3.3	Entwicklung der Primer	16
3.3.4	Gradienten-PCR	19
3.3.5	Optimieren der Primer	19
3.3.6	Untersuchung von größeren Probenmengen (LI-COR DNA Analyzer)	21
4.	Diskussion	25
4.1	Mikrosatelliten Anreicherung nach der Reporter-Genom-Methode	25
4.2	Entwicklung der Primer	26
4.2.1	Vorbereiten der Sequenzen (Vektor, Alignment, Suche nach Mikrosatelliten)	26
4.2.2	Entwicklung und Optimierung der Primer	27
4.3	Auswertung der Acrylamid-Gele	28
4.3.1	Wenig variable Loci (Primer C5 und S7)	29
4.3.2	Variable Loci zwischen Populationen (C1 und C3)	29
4.4	Populationsstruktur von <i>M. saponariae</i> und mögliche Gen-Duplikationen bzw. Gen-Kluster / Ausblick	31
5.	Zusammenfassung / Abstract	33
5.1	Zusammenfassung	33
5.2	Abstract	34
6.	Abkürzungsverzeichnis	35
7.	Literaturverzeichnis	36
8.	Anhang	39
8.1	Laborbedarf	39
8.1.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien	39
8.1.2	Chemikalien	39
8.1.3	Lösungen, Puffer und Medien	40
8.1.4	Kits	40
8.1.5	Primer	40
8.1.6	Längenmarker	41
8.1.7	Datenverarbeitungsprogramme / Datenbanken	41
8.2	Verwendete DNA-Isolationen	41
8.3	Ergänzende Daten	42
9.	Danksagung	47
10.	Selbständigkeitserklärung	48

1. Einleitung

1.1 *Microbotryum saponariae* und seine Wirte aus der Gattung *Saponaria*

Der Brandpilz *Microbotryum saponariae* M. LUTZ, GÖKER, M. PIATEK, KEMLER, BEGEROW et OBERW. gehört zu den Basidiomycota. Brandpilze zeichnen sich durch einen diphasischen Lebenszyklus, mit einer haploiden saprophytischen, sowie einer dikaryotischen parasitischen Phase aus (DAY & GARBER 1988). *M. saponariae* parasitiert in den Antheren vieler Vertreter der Gattung *Saponaria* L., welche zur Familie der Caryophyllaceae gehört (LUTZ et al. 2004).

Die Antherenbrände der Caryophyllaceae gehören zu den ältesten beschriebenen Brandpilzen (WERTH 1911). Durch kontroverse Diskussionen um Artabgrenzungen und Systematik kam es in den letzten Jahren zu Umgruppierungen, Neubeschreibungen und Namensänderungen innerhalb der Gattung *Microbotryum* (DAY & GARBER 1988, VÁNKY 2004). Daher wurde von VÁNKY (2004) gefordert verschiedene *Microbotryum*-Arten, so auch *Microbotryum* auf *Saponaria* in der Sammelart *M. violaceum* zusammenzufassen, bis eine eindeutige Klassifizierung möglich ist. Durch molekulare Methoden wie Sequenzierung der internal transcribed spacer (ITS)-rDNA, konnte in den letzten Jahren eine bessere Artabgrenzung erreicht werden (LUTZ et al. 2005, LUTZ et al. 2008, LE GAC et al. 2007).

In Abb. 1 ist der Generationswechsel, der auf Caryophyllaceae vorkommenden Antherenbrände, am Beispiel von *Microbotryum lychnidis-dioicae* (LIRO) G. DEML & OBERW. auf seinem Wirt *Silene latifolia* POIRET dargestellt. Bildet die infizierte Pflanze Blüten, so sind diese steril und die Antheren mit einer großen Menge Teliosporen (2n) gefüllt (a), welche die Pollen vollständig ersetzen. Der Pilz verhindert die volle Entwicklung des Gynoeceums und in weiblichen Blüten wird die Antherenbildung induziert (WERTH 1911), so dass auch in diesen Blüten Brandsporen gebildet werden. Die Sporen werden von blütenbesuchenden Insekten übertragen (b). Auf der Narbe von gesunden Pflanzen (c) keimen die Sporen erst, wenn die Blüte verwelkt (WERTH 1911). Die Brandspore keimt mit einer Basidie, wobei der Zellkern sich meiotisch teilt. Dabei werden die einzelnen Zellkerne durch Septen voneinander getrennt (Phragmobasidie). Von der Basidie werden vier Basidiosporen abgeschnürt (d), wobei jeweils zwei den gleichen Paarungstyp haben (a_1 bzw. a_2). Die Basidiosporen können sich über Knospung vegetativ vermehren und Hefekolonien bilden (DAY & GARBER 1988). Treffen zwei kompatible Hefen mit unterschiedlichem Paarungstyp auf einem geeigneten Wirt aufeinander, können sie fusionieren (e) und bilden ein Dikaryon. Über eine Infektionshyphe wächst der Pilz in den Wirt ein (f). Da Weiße Lichtnelken krautige ausdauernde Pflanzen sind (BERNASCONI 2009), deren oberirdischer Teil im Winter abstirbt

(b), überwintert *Microbotryum* in den Wurzeln der Pflanze (g) (SCHÄFER et al. (Eingereicht)). Treibt die Lichtnelke im folgenden Jahr aus (h), ist ein Großteil der Blüten mit Teliosporen infiziert (a). Die Pflanze ist meist erst ab dem zweiten Jahr vollständig infiziert (WERTH 1911).

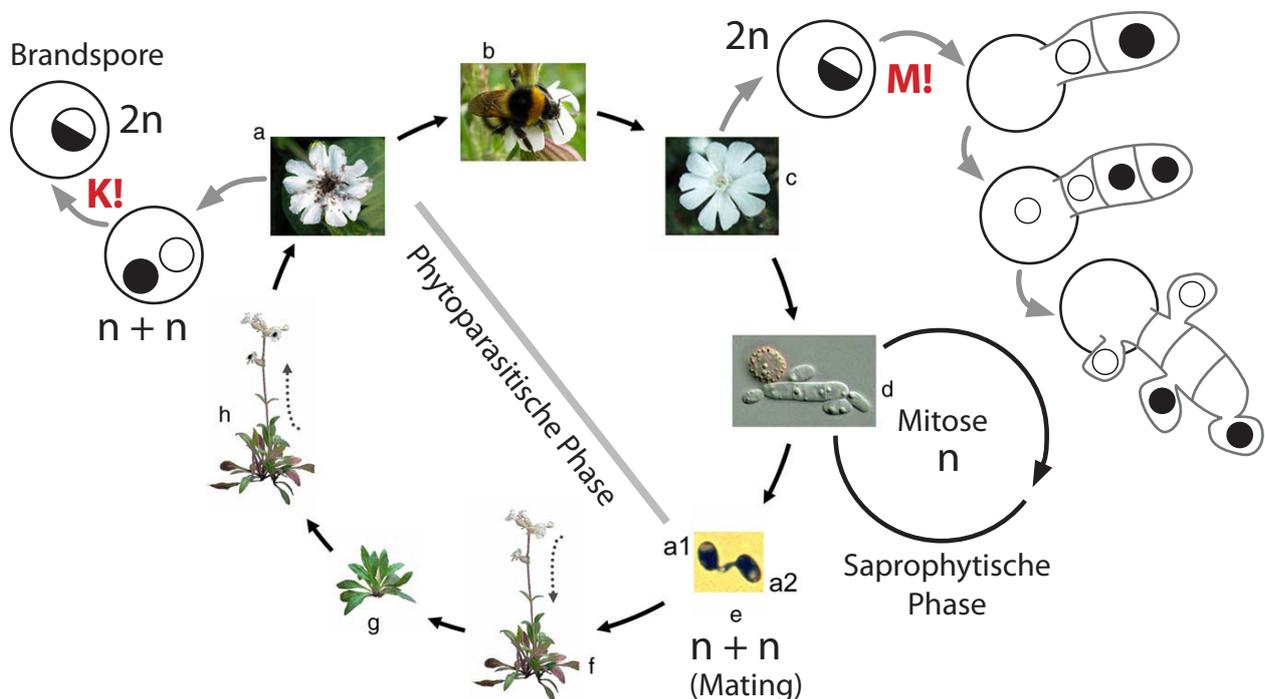


Abb. 1: Generationswechsel von *Microbotryum lychnidis-dioicae* (verändert nach LÓPEZ-VILLAVICENCIO 2007). Genaue Erläuterungen im Text.

1.2 Molekulare Methoden

Es gibt verschiedene molekulare Methoden, Individuen auf Art-, Gattungs- oder Populationsebene voneinander zu unterscheiden. Die unterschiedlichen Typen von molekularen Markern haben Vor- und Nachteile, welche bei der Planung von Projekten berücksichtigt werden müssen (SCHLÖTTERER 2004). In Abb. 2 ist das Auflösungsvermögen ausgewählter Marker dargestellt.

Durch molekulare Methoden wie DNA-Barcoding ist es inzwischen möglich Arten schnell und kostengünstig zu identifizieren (CHASE 2009). Dabei wird meist ein spezifischer Genombereich sequenziert, welcher mit Datenbanken z.B. der Gendatenbank NCBI abgeglichen werden kann. Innerhalb der Basidiomycota eignet sich die nicht kodierende ITS innerhalb der rDNA, um auch nah verwandte Arten zu unterscheiden (ANDERSON & CAIRNEY 2004).

Um Populationen einer Art zu unterscheiden ist die ITS-Region zu sehr konserviert. Marker wie AFLP, RAPD, RFLP, und Mikrosatelliten (kurze Sequenzrepeats) ermöglichen eine höhere genetische Auflösung (SCHLÖTTERER 2004).

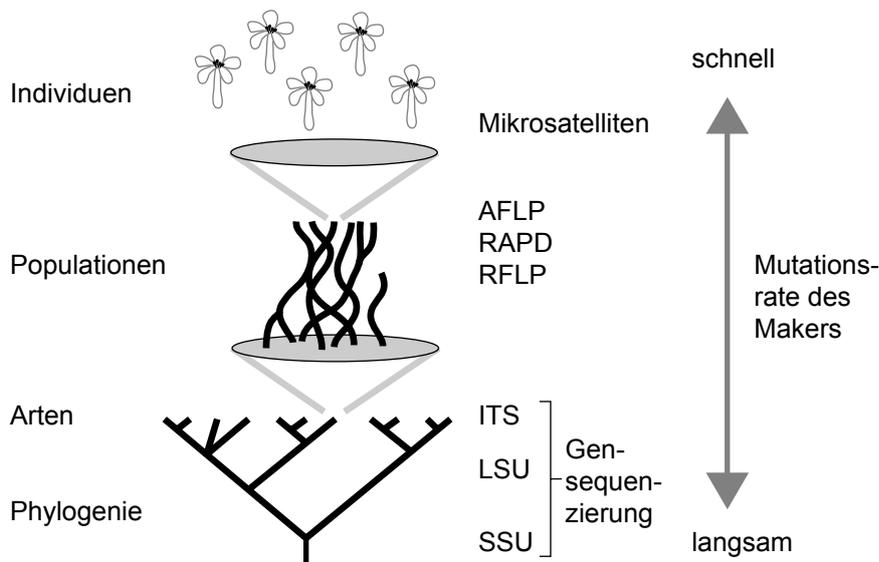


Abb. 2: Ungefähres Auflösungsvermögen ausgewählter molekularer Marker (verändert nach HELD 2006). Genaue Erläuterungen im Text.

Für den Einsatz von Mikrosatelliten als Marker müssen Sequenzen der zu untersuchenden Organismen vorhanden sein, welche Mikrosatelliten enthalten. Zudem ist es wichtig, dass anhand der vorhandenen Sequenzen Mikrosatelliten flankierende Primer erstellt werden können. Sind diese kritischen Schritte der Markerentwicklung überwunden (DUTECH et al. 2007), stehen zuverlässige und einfach zu handhabende Marker zur Verfügung. Eine Nutzung von vorhandenen Mikrosatelliten-Primern für nah verwandte Arten ist nicht in allen Fällen möglich (DUTECH et al. 2007). Gegenüber anderen Markern zeichnen sich Mikrosatelliten durch ihren hohen Informationsgehalt aus, da je Gen-Locus meist mehrere Allele vorkommen können (HELD & LEESE 2008). Durch die Kombination von mehreren polymorphen Loci haben Mikrosatelliten-Marker ein höheres Auflösungsvermögen als andere Marker (SELKOE & TOONEN 2006). Aufgrund der Mutations-Mechanismen von Mikrosatelliten (vgl. 1.3) zeigen verschiedene Organismengruppen unterschiedlich starke Polymorphismen in ihren Mikrosatelliten (OLIVEIRA et al. 2006, DUTECH et al. 2007). Besonders wenn keine Mikrosatellitensequenz-Datenbank für den zu untersuchenden Organismus vorliegt, kann es sinnvoll sein AFLPs zurückzugreifen (BENSCH & ÅKESSON 2005).

1.3 Mikrosatelliten als molekulare Marker

Bei Mikrosatelliten handelt es sich um kurze DNA-Bereiche, in denen ein Muster (Motiv) aus wenigen Basen mehrfach wiederholt wird z.B. $(AG)_5 = AGAGAGAGAG$. Meistens werden Wiederholungen von 1 bis 6 bp großen Motiven als Mikrosatellit bezeichnet (SELKOE & TOONEN 2006, BUSCHIAZZO & GEMMELL 2006, OLIVEIRA et al. 2006, DUTECH et al. 2007), jedoch kommen auch Definitionen bis 10 bp (LEVINSON & GUTMAN 1987) vor. In der vorliegenden Arbeit wird ein

Mikrosatellit als Repeat mit unbegrenzter Länge (PUPKO & GRAUR 1999) und Motiven von bis zu 6 bp definiert.

Mikrosatelliten entstehen vermutlich durch DNA replication slippage (LEVINSON & GUTMAN 1987, vgl. Abb. 3). Löst sich die Polymerase bei der Replikation eines Mikrosatelliten, trennt sich auch der DNA-Doppelstrang (b). Der Einzelstrang kann sich nun versetzt an den Mikrosatellit des Templatestrangs anlagern (b). Wird der Fehler nicht durch Reparaturmechanismen erkannt (c), kommt es zur Längenänderung des entsprechenden Mikrosatelliten (SCHLÖTTERER 2000). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass es keine Mindestlänge von Mikrosatelliten gibt ab der es zu DNA slippage kommen kann (PUPKO & GRAUR 1999). Das bedeutet, dass Mikrosatelliten ‚spontan‘ entstehen können, indem eine Sequenz aus wenigen Basenpaaren vervielfältigt wird. Das Entstehen von neuen Mikrosatelliten ist, im Vergleich zur Längenvariabilität der Mikrosatelliten, jedoch ein sehr seltenes Ereignis. Änderungen in der Länge der

Mikrosatelliten nehmen mit steigender Motiv-Wiederholung zu (PUPKO & GRAUR 1999, ELLEGREN 2004). Mit zunehmender Länge eines Mikrosatelliten nimmt auch die Chance von Punktmutationen innerhalb des Mikrosatelliten zu, wodurch dessen Länge stabilisiert wird (ELLEGREN 2002). Weitere Punktmutationen lassen den Mikrosatellit schließlich ganz verschwinden. Diese Theorie führte zum ‚lifecycle-Modell‘, welches, über einen langen Zeitraum betrachtet, ein ständiges Entstehen und Verschwinden von Mikrosatelliten postuliert (BUSCHIAZZO & GEMMELL 2006). Ab einer gewissen Länge werden Mikrosatelliten zusätzlich durch ungleiches Crossing-Over zwischen homologen Chromosomen verändert (OLIVEIRA et al. 2006). So kann es bei Crossing-Over-Ereignissen zum Verlust oder Zugewinn von gleich mehreren Repeats kommen, während beim replication slippage

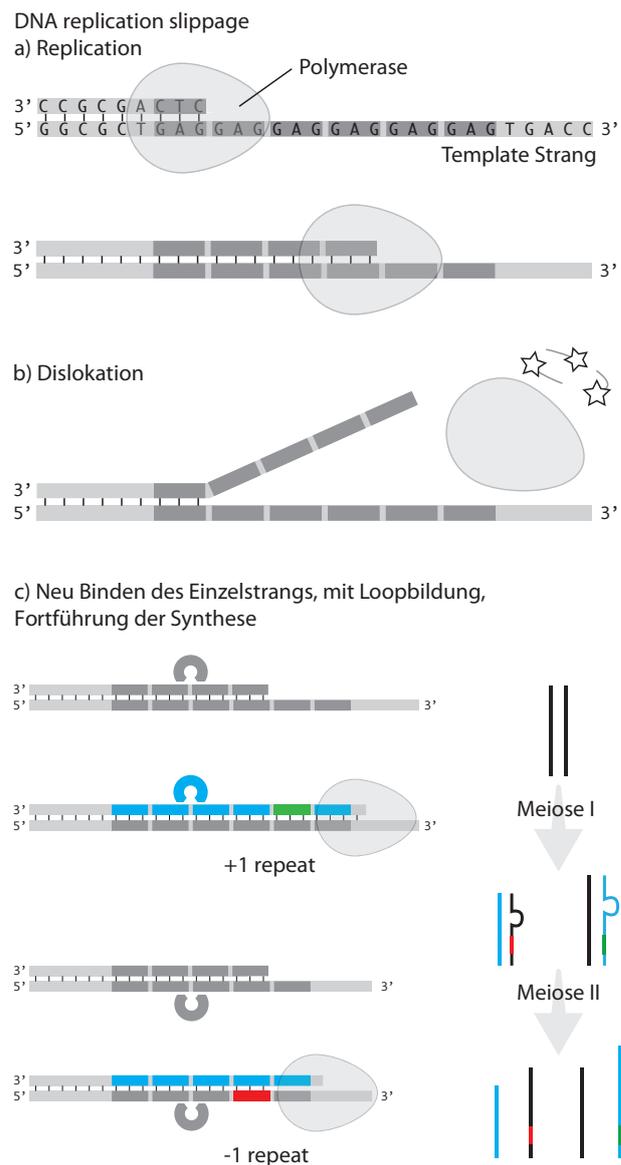


Abb. 3: DNA replication slippage nach SIA et al. 1997 (verändert, Polymerase nicht Maßstabsgetreu). Weitere Erläuterungen im Text.

die Mikrosatellitenlänge nur in kleinen Schritten verändert wird (stepwise mutation modell, SSM, OLIVEIRA et al. 2006). Mikrosatelliten werden noch von einer Vielzahl von Faktoren beeinflusst (BUSCHIAZZO & GEMMELL 2006, Abb. 2). Wie polymorph Mikrosatelliten einer Art sind, wird jedoch maßgeblich von den verfügbaren DNA-mismatch-repair-Mechanismen und deren Effektivität beeinflusst (STRAND et al. 1993). Ohne Reparatur des DNA slippage ist die Mutationsrate sehr hoch, was sich sogar *in vitro* in Form von Stotterbanden („stutter bands“) beobachten lässt (SHINDE 2003, HELD & LEESE 2008).

Durch Primer, die in den Mikrosatelliten-flankierenden Bereichen (spezifisch) greifen, sollen sich die in dieser Arbeit untersuchten *Microbotryum*-Populationen unterscheiden lassen.

1.4 Zielsetzung, Versuchsplanung und Herangehensweise

Ziel dieser Arbeit ist es, eine molekulare Methode zu etablieren, welche die Unterscheidung von *Microbotryum*-Populationen ermöglicht. So soll es in Zukunft möglich sein, Strukturen, Interaktionen und Entwicklungen von verschiedenen Populationen zu erfassen. Mikrosatelliten sind für dieses Vorhaben, aufgrund ihres polymorphen Charakters geeignete Marker (SELKOE & TOONEN 2006, PEARSE & CRANDALL 2004).

Da bereits ein mit Mikrosatelliten angereicherter Sequenz-Datensatz zur Verfügung stand, galt es die vorhandenen Sequenzen auszuwerten und Primer zu entwickeln, welche in den flankierenden Bereichen der Mikrosatelliten (spezifisch) greifen. Diese Primer sollen mit verschiedenen Proben getestet werden, um ihr Potential für ökologische Studien zu erfassen. In Abb. 4 ist die Herangehensweise in dieser Arbeit im Wesentlichen zusammengefasst.

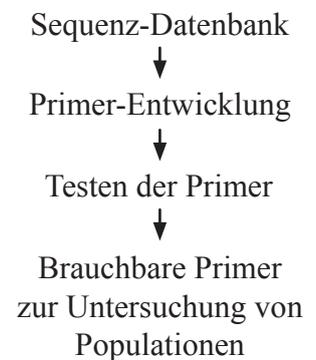


Abb. 4: Geplante Herangehensweise in dieser Arbeit.

2. Material und Methoden

2.1 Laborbedarf

Eine Liste der Chemikalien, der Geräte, Primer und Datenverarbeitungsprogramme ist ab Seite 8 im Anhang zu finden.

2.2 Sequenz-Datenbank

Die Sequenzen stammten von einer *Microbotryum*-Aufsammlung auf *Saponaria officinalis* aus Hayingen (Baden-Württemberg). *Microbotryum*-Sporen wurden angezchtet und 8 haploide Kulturen erzeugt, sowie deren Paarungstyp über Amplifikation der Pheromonrezeptoren bestimmt (YOCKTENG et al. 2007). Alle Kulturen hatten den Paarungstyp Pra1. Von einer Kultur wurde mittels Phenol/Chloroform-Isolation die DNA extrahiert (verändert nach HOFFMAN & WINSTON 1987).

Die Erstellung der Sequenzdaten wurde durch Dr. Florian Leese vom Lehrstuhl für Evolutionsökologie und Biodiversität der Tiere (RUB) durchgeführt. Dabei wurde ein Protokoll von LEESE et al. 2008 verwendet, welches auf einer Puplicaton von NOLTE et al. 2005 basiert (vgl. Abb. 5). Bei der Reporter-Genom-Methode wurde die zu analysierende DNA (Ziel-Genom) zunächst über Restriktion in kleine Fragmente zerteilt und gegen ein Genom eines taxonomisch möglichst weit entfernten Organismus (Reporter-Genom) hybridisiert. Als Reporter-Genom wurde das Genom von *Mus musculus domesticus* L. verwendet. Da sich die Genome der beiden Organismen stark unterscheiden, sollten vor allem Fragmente mit gleichen Motiven (z.B. Mikrosatelliten) hybridisieren. Die hybridisierten Fragmente wurden in Vektoren ligiert und mit *E. coli* vervielfältigt. Anschließend erfolgte eine Sequenzierung der Fragmente. Da Mikrosatelliten, wenn auch in unterschiedlicher Abundanz, in allen Eukaryonten vorkommen (DUTECH et al. 2007) sollte die Reporter-Genom-Methode mit allen Organismen funktionieren.

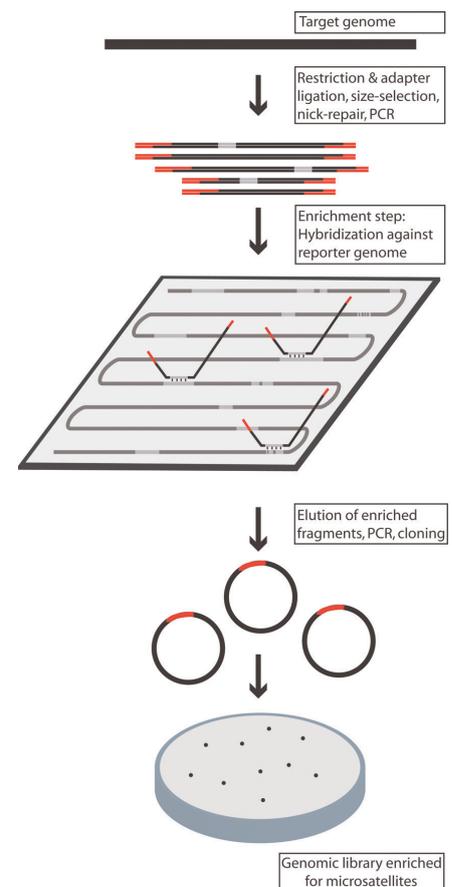


Abb. 5: Prinzip des Reporter-Genom-Protokolls (aus LEESE et al. 2008). Weitere Erläuterungen im Text.

2.3 Entwicklung der Primer: Detaillierte Vorgehensweise (Übersicht)

Abb. 6 gibt eine detaillierte Übersicht über die Vorgehensweise in dieser Arbeit. Als Ausgangsdatensatz lagen 96 Sequenzen von *M. saporariae* vor (A). Zur Primer-Erstellung wurden verschiedene Programme eingesetzt.

Mit dem Programm Staden Package (STADEN et al. 2000) und den integrierten Modulen Stamp (KRAEMER et al. 2009) und Phobos (MAYER 2010) können Multiplex-Primer automatisiert entwickelt werden. Das Programmpaket übernimmt alle nötigen Arbeitsschritte, ausgehend von den Sequenzen (A) bis zu den fertigen Primer-Sequenzen (F)¹.

Alternativ können Primer auch in mehreren Schritten über Verwendung verschiedener Programme entwickelt werden. Mit dem Programm Sequencher

4.8 wird der Klonierungsvektor aus den Sequenzen entfernt (B) und die bereinigten Sequenzen über ein Alignment auf Duplikate überprüft (C). Duplikate und Sequenzen mit schlechter Qualität wurden aus der Datenbank entfernt. Die verbleibenden Sequenzen wurden mit dem Programm Geneious Pro (DRUMMOND et al. 2009) manuell über Dotplots bzw. automatisch mit dem Phobos-Plugin (MAYER 2010) auf Mikrosatelliten analysiert (D). Für Sequenzen, die Mikrosatelliten enthalten, wurde über das Programm Primer3 (ROZEN & SKALETSKY 2000) Primer erstellt (F).

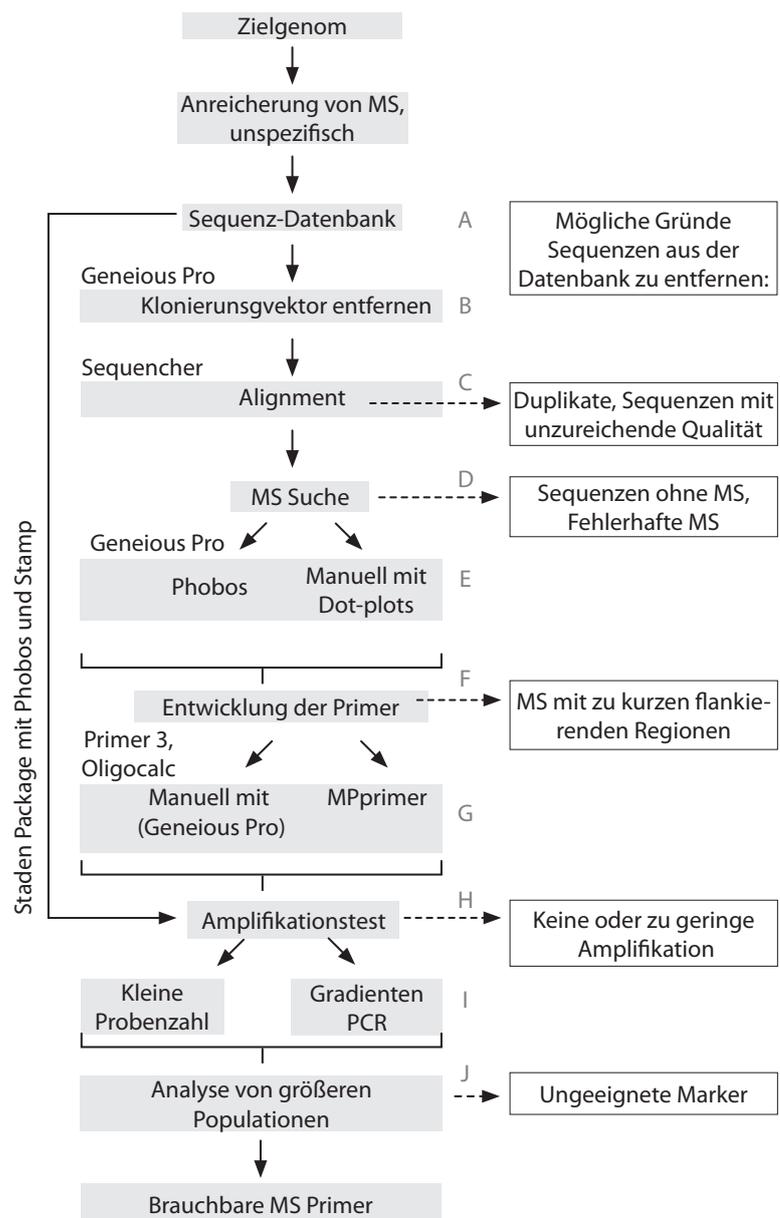


Abb. 6: Vollständige Übersicht über die Arbeitsschritte der Primer Erstellung, sowie mögliche Ausschlusskriterien für einzelne Sequenzen. Verwendete Software steht über den entsprechenden Boxen. Weitere Erläuterungen im Text.

¹ Mit dem Staden Package konnten keine Primer erstellt werden, da das Stamp-Modul Fehler enthielt (persönlicher Kontakt, Entwicklerteam).

Primer3 ist in Geneious Pro sowie in MPprimer (SHEN et al. 2010) integriert. Das Programm MPprimer ist für die Entwicklung von Multiplex-Primern konzipiert und erstellt Primer-Sets mit möglichst gleicher Annealing-Temperatur, wenig Self-Annealing und unterschiedlich langen Amplifikationsprodukten. Mit Geneious Pro mussten die erstellten Primer manuell möglichst multiplex-kompatibel ausgewählt werden (G). Vor der Herstellung der Primer wurden diese mit dem Programm Oligocalc (KIBBE 2007) auf mögliche Hairpin-Bildung, Self-Annealing und Complementarity überprüft, welche die Funktionsfähigkeit der Primer beeinträchtigen könnten. Die erstellten Primer wurden zunächst in einer Gradienten-PCR auf ihre Annealing-Temperatur bzw. unspezifische Amplifikation überprüft und mit geringer Probenzahl getestet (I). Primer, die zuverlässig amplifizierten, wurden mit einer größeren Probenmenge getestet (J).

2.3.1 Sequenzvorbereitung mit Sequencher

Alle Sequenzen wurden in Sequencher geladen und der Klonierungs-Vektor aus den Sequenzen entfernt (Abb. 7). Über ‚Assemble Automatically‘ wurde ein Alignment durchgeführt und ähnliche Sequenzen in Contigs zusammengefasst. Beim Assembling wurden die Standard-einstellungen verwendet (dirty data, with realignment, 3‘ gapplacement, min overlap = 20, min match = 85%). Bei zu Contigs zusammengefassten Sequenzen wurde für weitere Arbeitsschritte die Consensus-Sequenz verwendet (‚Consensus Inclusively‘ bzw. ‚Consensus by Popularity‘).

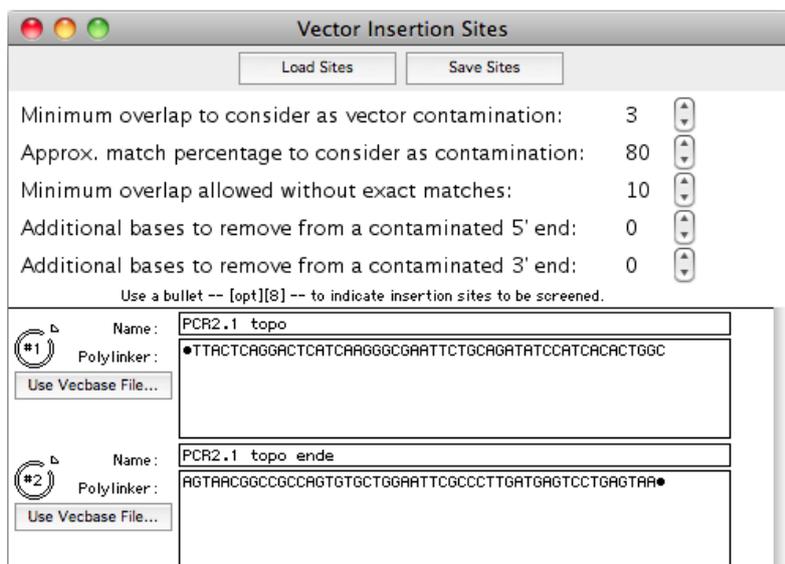


Abb. 7: Entfernen des Klonierungsvektors mit dem Programm Sequencher.

2.3.2 Mikrosatellitensuche in Geneious Pro (mit Phobos und Dotplots)

Die Einzel-Sequenzen bzw. die Consensus-Sequenzen der Contigs wurden in Geneious Pro importiert. Zunächst mussten die Sequenzen auf Mikrosatelliten überprüft werden.²

Mit dem Phobos-Modul können alle vorhandenen Sequenzen auf Mikrosatelliten durchsucht werden. Es empfiehlt sich nach Mikrosatelliten zu suchen, welche aus 2 oder mehr bp großen Motiven bestehen und die Kriterien für minimale Länge und Reinheit der Mikrosatelliten zu variieren, bis hauptsächlich verwendbare Mikrosatelliten gefunden werden (Weitere Erläuterungen im Ergebnisteil unter 3.3.2). Zusätzlich erfasst Phobos die Eigenschaften jedes Mikrosatelliten (z.B. Länge, Motiv, Perfektion).

Bei der Mikrosatelliten-Suche über Dotplot-Diagramme wird die Sequenz gegen sich selbst aufgetragen und übereinstimmende Basen durch einen Punkt gekennzeichnet (MAIZEL & LENK 1981). Abb. 8 zeigt ein Dotplot einer $(GT)_8$ -haltigen Sequenz. Die jeweilige Farbe entspricht je einem Nukleotid. Mit Geneious Pro kann von jeder Sequenz ein Dotplot-Diagramm erzeugt werden. So lassen sich Mikrosatelliten erkennen, müssen jedoch anschließend manuell charakterisiert werden.

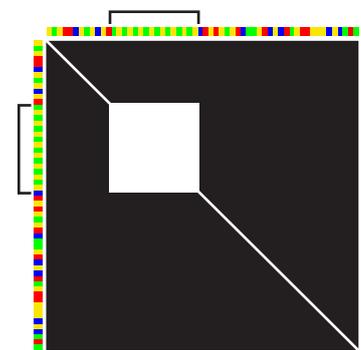


Abb. 8: Dotplot eines $(GT)_8$ MS (schematisch).

Um auszuschließen, dass nicht DNA des Reporter-Genoms sequenziert wurde, mussten die Sequenzen mit Datenbanken des NCBI über den BLAST-Algorithmus (ALTSCHUL et al. 1997) abgeglichen werden.

2.3.3 Entwicklung der Primer

Die Primer wurden mit dem Programm Primer3 erstellt, welches in MPprimer sowie Geneious Pro integriert ist. Bei der Erstellung der Primer mussten die gewünschten Eigenschaften der zu erstellenden Primer, sowie der zu amplifizierende Sequenzbereich, berücksichtigt werden. In der Literatur werden für z.B. T_m (Schmelzpunkt), GC-Gehalt, Primer-Größe teils sehr unterschiedliche Optima empfohlen (vgl. Tab. 1). Bei der Entwicklung der Primer wurde auf eine ähnliche T_m unter den verschiedenen Primern geachtet, um die Primer in derselben PCR-Reaktion verwenden zu können. Zudem wurde eine hohe T_m bzw. lange Primer gewählt, da so die Chance unspezifische Produkte zu amplifizieren verringert wird (HENEGARIU et al. 1997, MÜLHARDT 2009).

² Es empfiehlt sich nur eine Sequenz je Contig zu importieren und auf Mikrosatelliten zu durchsuchen. Anschließend kann bei Contigs die MS enthalten geprüft werden, mit welcher Methode die Consensus-Sequenz gebildet wird („Consensus Inclusively“ bzw. Consensus by Popularity“) bzw. ob manuelles Nachbessern notwendig ist.

Tab. 1: Empfohlene Parameter bei der Multiplex Primer Erstellung.

	HENEGARIU et al. (1997)	RÖMPLER et al. (2006)	SHEN et al. (2010)	MÜLHARDT (2009)
Primer-Länge; min - max	18 - 24 bp bzw. 28 -30 bp	18 - 35 bp	18 - 30 bp	18 - 30 bp
Schmelzpunkt (T _m)	55 - 58°C oder höher	52 - 72°C	58 - 65°C	55 - 80°C
GC-Gehalt	35 % - 60 %	20% - 80%	40% - 60%	40% - 60%
Δ T _m der verwen- deten Primer	---	max. 5°C	unter 3°C	---
Sonstiges, Hinweise			Produktgröße 100-500 bp	Anleitung für Standard PCR (keine Multiplex)

Zur Primererstellung in Geneious Pro wurden bis auf einen veränderten GC-Gehalt (40% - 60%) Standardeinstellungen verwendet. Je Sequenz wurden mehrere Primerpaare automatisch generiert, welche den Mikrosatelliten über flankierende Sequenzbereiche amplifizieren. Es wurde je Sequenz ein Primerpaar mit einer T_m von ca. 59°C ausgesucht. Dabei wurde versucht, die Länge der amplifizierten Fragmente unterschiedlich zu wählen.

Bei Verwendung des Programms MPprimer werden verschiedene Sets von Primern erstellt und untereinander auf Multiplex-Kompatibilität getestet. Dabei wurde der Wert für die optimale Größe der Primer auf 24 bp erhöht und ansonsten die Standardeinstellungen belassen. Zusätzlich musste für jede Sequenz ein Bereich angegeben werden, der amplifiziert werden soll (Zielbereich, Start und Ende des Mikrosatelliten). Für Geneious Pro und MPprimer wurden die gleichen Zielbereiche verwendet. Die entsprechenden Bereiche sind in Tab. 12 im Anhang aufgelistet. MPprimer gibt nach Angabe der Zielbereiche, sowie der ungefähren Fragmentgröße, verschiedene Multiplex-Primer-Sets aus, von denen das vom Programm empfohlene gewählt wurde.

Die Primer wurden mit Oligocalc auf mögliches Self-Annealing, Hairpin-Bildungen und Complementarity überprüft. Zusätzlich wurde die berechnete T_m von Oligocalc mit der von Geneious Pro verglichen. Primer bei denen es Probleme geben könnte, wurden manuell verändert (verschieben um einige bp) oder es wurde ein alternativer Primer ausgesucht.

2.3.4 Testen der Primer

Die hergestellten Primer wurden mit DNA der Kultur aus Hayingen getestet, da diese auch für die Erstellung der Sequenz-Datenbank genutzt wurde. Um die berechnete Annealing-Temperatur der Primer zu überprüfen, wurde eine Gradienten-PCR durchgeführt (50-70°C, vgl. Tab. 2).

Tab. 2: Temperaturgradient bei der Gradienten-PCR.

Reaktionsgefäß	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Temperatur in [°C]	50	50,5	51,2	53,2	55,2	58,4	61,8	64,6	66,8	68,4	69,6	70

Die Zusammensetzung der einzelnen PCR-Ansätze ist in Tab. 3 aufgeführt. Das PCR-Programm ist in Tab. 4 aufgelistet.

Tab. 3: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes für die Gradienten-PCR.

Bestandteil	Menge
ddH ₂ O	20,4 µl
Buffer Y (10x + 20 mM MgCl ₂)	2,5 µl
dNTP's (10 mM)	0,5 µl
Primer fp (10 pmol/µl)	0,5 µl
Primer rp (10 pmol/µl)	0,5 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,1 µl
DNA Isolation (Hayingen)	0,5 µl

Tab. 4: PCR-Programm für die Gradienten-PCR.

1	Denaturation	96°C	2:00
	34 Cycles		
2	Denaturation	96°C	0:20
3	Annealing	50-70°C	0:40
4	Extension	72°C	1:00
5	Extension	72°C	7:00
6	Storage	10°C	∞

Die PCR-Produkte wurden über ein Agarose-Gel in einer Elektrophorese aufgetrennt, die Gelbilder mit Photoshop invertiert und der Kontrast sowie die Sättigung angepasst. In weiteren PCRs wurde das PCR-Programm optimiert und mit einer kleinen Zahl an Proben getestet.

2.3.5 Untersuchung von größeren Probenmengen (LI-COR DNA Analyzer)

Mit dem LI-COR 4300 DNA Analyzer wird amplifizierte DNA über Elektrophorese in einem Acrylamid-Gel aufgetrennt. So sind Längenunterscheidungen der DNA-Fragmente bis zu einem bp Genauigkeit möglich. Über einen Fluoreszenzfarbstoff (IRD 800), welcher an dem Primer M13 angebracht ist, erkennt das Gerät die Fragmente (vgl. Abb. 9 B). Bei dem Durchlaufen des Gels werden die Fragmente von einem 800 nm Laser gescannt und ihre Leuchtintensität auf ein virtuelles Gelbild übersetzt. Über den mitlaufenden Längenstandard (50 - 700 bp) kann auf die Länge der Fragmente geschlossen werden.

Ein einziger Primer (je Primer-Paar) wird an seinem 5'-Ende um die Sequenz des M13 Primers erweitert. In der PCR wird der um M13 erweiterte Primer zusammen mit dem fluoreszenzmarkierten M13-Primer eingesetzt (vgl. Abb. 9 A).

Tab. 5: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes für die Analysen mit M13 gelabelten Primern.

Bestandteil	Menge
ddH ₂ O	20,4 µl
Buffer Y (10x + 20 mM MgCl ₂)	2,5 µl
dNTP's (10 mM)	0,5 µl
Primer fp / rp (10 pmol/µl)	0,5 µl
Primer fp / rp mit M13 gelabelt (10 pmol/µl)	0,5 µl
Primer M13 (10 pmol/µl)	0,5 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,1 µl
DNA Isolation (Hayingen)	0,5 µl

Tab. 6: PCR-Programm für die Analysen mit M13 gelabelten Primern.

1	Denaturation	96°C	2:00
	34 Cycles		
2	Denaturation	96°C	0:20
3	Annealing	55°C	0:40
4	Extension	72°C	1:00
5	Extension	72°C	45:00
6	Storage	10°C	∞

Die modifizierten Primer wurden zunächst mit einer kleinen Anzahl Proben getestet. Die mit Phenol/Chloroform isolierten Proben mussten im Vorfeld bis zu 1:100 verdünnt werden. Mit Plant Kit isolierte DNA wurde nicht verdünnt. Das PCR-Programm ist in Tab. 6 aufgelistet. Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes ist in Tab. 5 aufgeführt.

Da der Fluoreszenzfarbstoff lichtempfindlich ist, wurde das PCR-Produkt lichtgeschützt und kühl gelagert. Ob die Amplifikation der Fragmente erfolgreich verlief, wurde anschließend über Elektrophorese in einem 2% Agarose-Gel überprüft.

Die PCR-Produkte wurden für die Auftrennung im LI-COR vorbereitet. Waren im Agarose-Gel Banden zu erkennen, wurden die entsprechenden PCR-Produkte verdünnt. Anschließend wurde in eine 96-Well-Platte 1 µl PCR-Produkt vorgelegt und mit 1 µl LI-COR Ladepuffer vermischt.

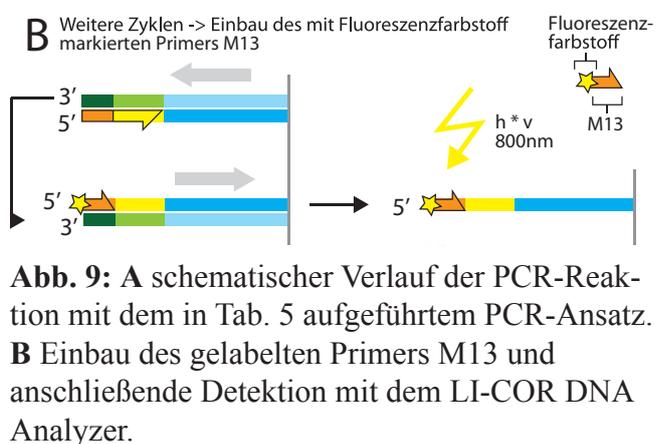
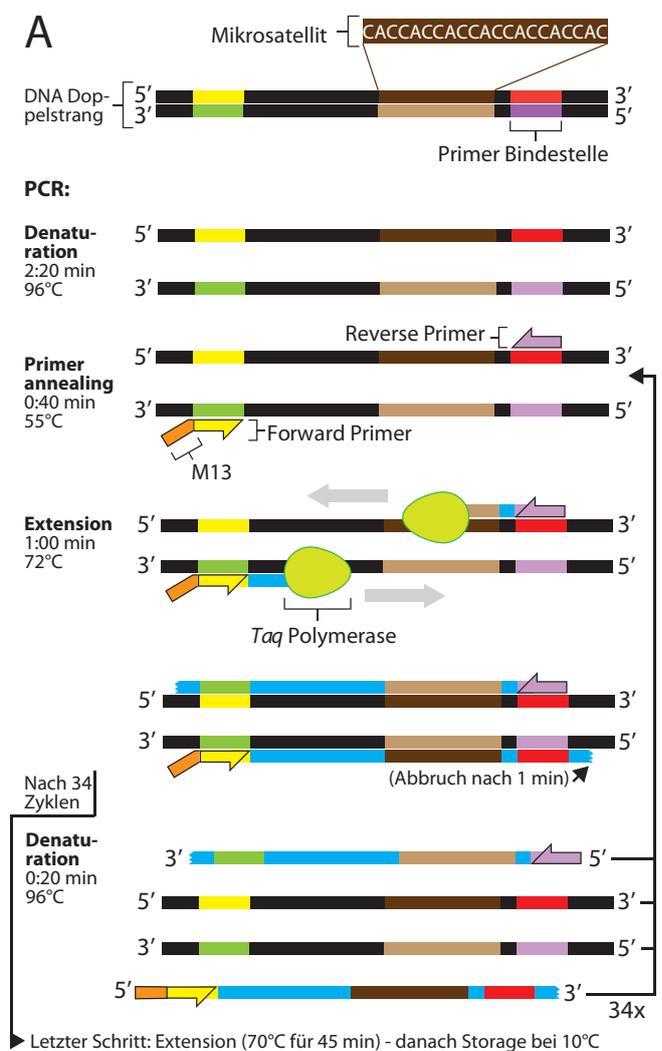


Abb. 9: A schematischer Verlauf der PCR-Reaktion mit dem in Tab. 5 aufgeführten PCR-Ansatz. B Einbau des gelabelten Primers M13 und anschließende Detektion mit dem LI-COR DNA Analyzer.

Die DNA wurde durch Erhitzen (95°C für 3 min) denaturiert und dann auf Eis gekühlt. Das Acrylamid-Gel wurde mit den vorbereiteten Proben beladen und die DNA-Fragmente über Elektrophorese (3 h) aufgetrennt.

2.3.6 Sequenzieren von Amplifikaten

Im Fall von Mehrfachbanden kann es sinnvoll sein Amplifikate zu sequenzieren, um mit dem LI-COR DNA Analyzer gewonnene Ergebnisse zu verifizieren. Um einzelne Amplifikate sequenzieren zu können, müssen sich diese im Agarose-Gel weit genug auftrennen. Ist dies nicht der Fall, ist eine Sequenzierung nur über Klonierung möglich.

Um eindeutige Loci für die Sequenzierung zu erhalten, wurde das verfügbare PCR-Produkt über Elektrophorese aufgetrennt (2% Agarose-Gel). Unter UV-Licht wurden die ethidiumbromid-gefärbten Amplifikate mit einem Skalpell ausgeschnitten. Mit dem MyBudget Double Pure Kit (Protokoll 1; Aufreinigung von Gelen < 15mg) wurde die im Gel enthaltene DNA eluiert und über ein Photometer (mit IMPLEN Küvette) die Reinheit und Konzentration der aufgereinigten Fragmente überprüft. Die Sequenzierung übernahm der Sequenzierservice des Lehrstuhls für Biochemie (RUB). Sequenziert wurde mit einem Kapillarelektrophorese-Gerät (ABI 3130 XL Genetic Analyzer) der Firma Applied Biosystems.

3. Ergebnisse

3.3.1 Sequenzvorbereitung mit Sequencher

Die detaillierte Contig-Liste der 96 Sequenzen (ohne Klonierungsvektor) ist in Tab. 10 aufgeführt. In Abb. 10 werden die Ergebnisse des Alignments mit und ohne Vektor verglichen.

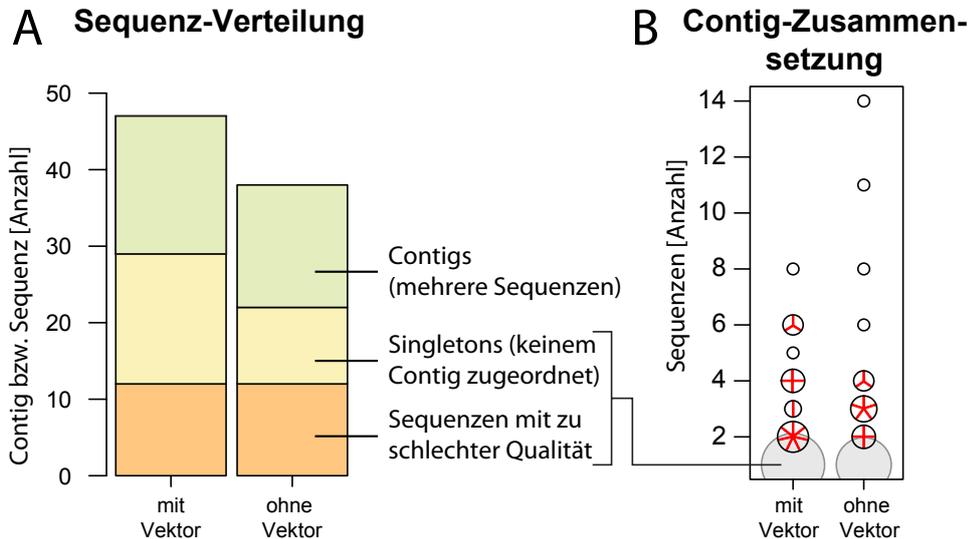


Abb. 10: **A** Alignment der Sequenzen mit und ohne Vektor. **B** Zusammensetzung der Contigs. Anzahl der roten Linien / Kreisgröße = Anzahl der Contigs mit entsprechender Anzahl an Sequenzen (Y-Achse).

In beiden Assemblies wurden je 12 Sequenzen nicht berücksichtigt, da ihre Qualität nicht ausreichte. Die verbliebenen Sequenzen wurden ohne Klonierungsvektor 26% besser verarbeitet, als mit (A). Dies zeigt sich auch in der Contig-Zusammensetzung (B). Das Assembly der Sequenzen mit Vektor führte zu vielen Contigs aus nur zwei Sequenzen. Ohne Vektor konnten mehr Sequenzen in größeren Contigs zusammengefasst werden. So ist die Zahl der nicht zugeordneten Sequenzen ohne Vektor über 40% geringer als bei den Sequenzen mit Vektor.

Contig 12 (ohne Vektor) zeigte Auffälligkeiten. Die ersten 370 bp des Contigs zeigten, bis auf

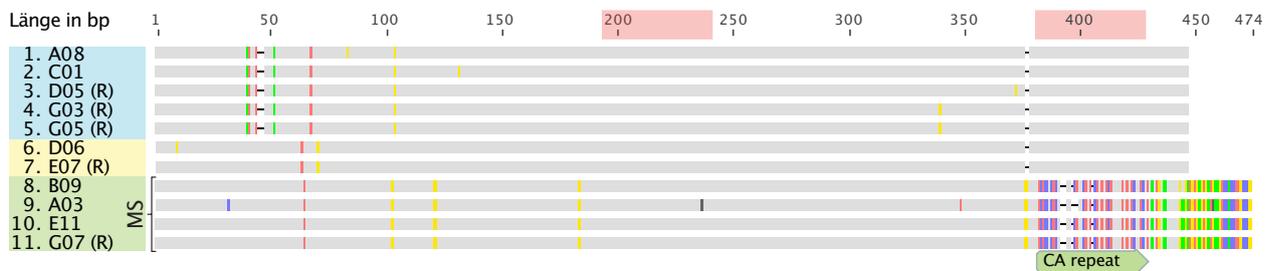


Abb. 11: Sequenzansicht von Contig 12. Farbige Bereiche kennzeichnen nicht übereinstimmende Basen, -, ' = Gaps (Geneious Pro Alignment mit Standardeinstellungen). (R) = Reverse complement. Hellrote Balken = Ansatzstellen für Hybridisierungen zwischen Ziel- und Reporter-Genom (bei 400 bp nur in Sequenzen 8-11).

einen kleinen Bereich bei 40 bp (Abb. 11), eine gute Übereinstimmung. Im Endbereich wichen die Sequenzen jedoch erheblich voneinander ab. Insgesamt konnte das Contig in drei Untergruppen aufgeteilt werden (farbig hinterlegt).

3.3.2 Suche nach Mikrosatelliten in Geneious Pro (mit Phobos und Dotplots)

Von 26 getesteten Sequenzen bzw. Contigs, enthielten nur 31% ausreichend lange Mikrosatelliten. Über Dotplots als auch über die automatische Mikrosatelliten-Suche mit Phobos wurden die gleichen Mikrosatelliten gefunden. Bei Verwendung des Phobos-Moduls war es jedoch sinnvoll, die Suchparameter restriktiver zu wählen. Wurden die Standardeinstellungen verwendet, fand Phobos in den 96 Sequenzen 282 Mikrosatelliten. Abb. 25 (im Anhang) zeigt die verwendeten Einstellungen, mit denen verwendbare Mikrosatelliten gefunden wurden.

Die von Phobos gefundenen Mikrosatelliten unterschieden sich teilweise von den manuell gesuchten Mikrosatelliten (Abb. 12). Es handelte sich dabei um die selben Bereiche, jedoch wurden in den manuellen Annotationen die Mikrosatelliten zum Teil etwas länger gewählt. In Tab. 7 sind die Eigenschaften der gefundenen Mikrosatelliten aufgelistet.

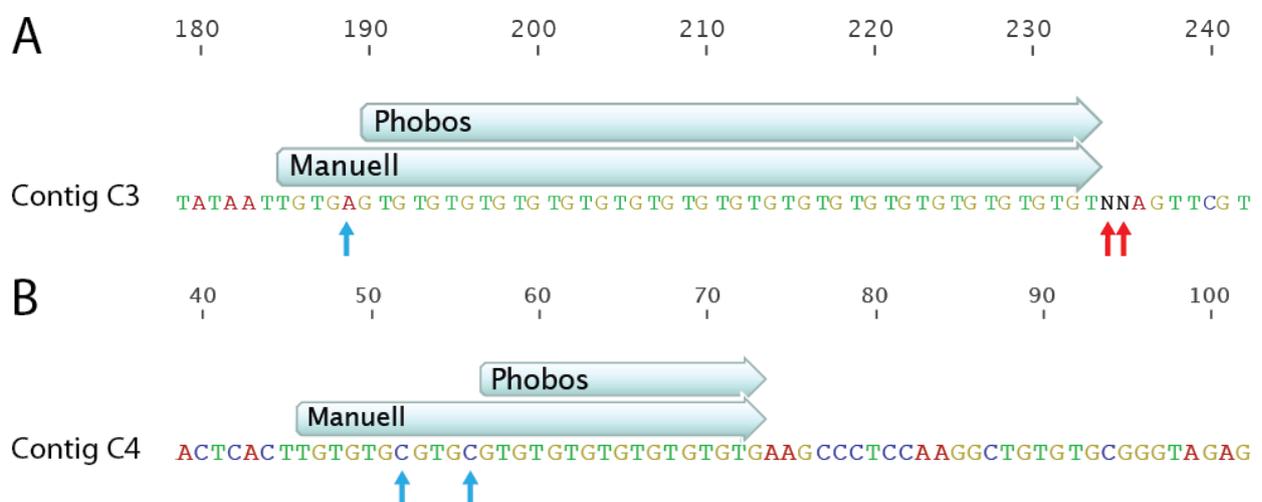


Abb. 12: Vergleich ausgewählter Mikrosatelliten. Blaue Pfeile kennzeichnen Punktmutationen, rote Pfeile nicht lesbare Nukleotide bei der Sequenzierung. **A** Contig C3. **B** Contig C4.

Tab. 7: Mit Phobos gefundene Mikrosatelliten.

Sequenz	(Motiv) _{Wiederholungen}	Länge in bp	Perfektion in %	Hinweise
C1	(AC) _{21,5}	43	97,73	
C2	(AC) ₃₁	62	96,77	
C3	(TG) _{8,5}	17	100	
C4	(TG) ₂₂	44	100	
C5	(CAGTGT) _{6,5} (TG) ₁₃	39 26	100 100	Doppel MS

S7	(GAG) ₇	21	100	
S8	(CA) _{71,5}	143	97,20	
S9	(ATCTGGGTAATATA-CTCTGTCTACTCCTTGAC) _{8,75}	280	94,29	Minisatellit mit 32er Motiv

In Abb. 13 sind die Sequenzen als Dotplot-Diagramme dargestellt. Die meisten Sequenzen wiesen Dinukleotid-Repeats auf, wodurch die parallelen Linien sehr dicht zusammen liegen. Bei größeren Motiven haben die Linien einen größeren Abstand, so auch ein Minisatellit mit einem 32 bp großen Motiv (S9). Außerdem ist zu erkennen, dass der Minisatellit die gesamte Box ausfüllt. Ist ein Mikrosatellit in seinen Repeats unterbrochen, weisen auch die parallelen Linien entsprechende Unterbrechungen auf (S8). Sequenz C5 enthält 2 perfekte Mikrosatelliten, welche nah beieinander liegen.

Der Abgleich aller 26 Sequenzen / Contigs mit Gendatenbanken des NCBI (blastn; nr (Entrez Query: *Mus musculus*, erstes Ergebnis; nach bestem ‚E-Value‘ geordnet) zeigte, dass sich alle *M. saponariae* Sequenzen mit dem Maus-Genom mindestens in 20 bp überschneiden (Max; 202 bp, Median: 38 bp, Ø = 62,81 bp). Die Sequenzen aus Contig C1 hybridisierten mit dem *Mus musculus*-Genom im Bereich des CA-Repeats und zusätzlich in einem ca 30 bp großen Bereich bei 220 bp (vgl. Hellrote Balken, Abb. 11).

3.3.3 Entwicklung der Primer

Die Primer wurden über den manuellen Weg entwickelt (vgl. 2.3). Tab. 12 im Anhang gibt die Zielbereiche in den Sequenzen an, welche mit Primern amplifiziert werden sollten. Zusätzlich musste für MPprimer die maximale Größe der zu amplifizierenden Fragmente angegeben werden. Wird diese zu lang gewählt, z. B. Gesamtlänge der entsprechenden Sequenz, findet MPprimer keine passenden Primer-Sets. Erst nach Angabe von restriktiveren Größenbereichen, war das Programm in der Lage Primer zu generieren.

In Tab. 13 und in Tab. 14 im Anhang sind die mit Primer3 entwickelten Primer aufgelistet. Abb. 14 zeigt eine Übersicht der entwickelten Primer, sowie die Länge der amplifizierten Fragmente. Einige Sequenzen wurden nacheditiert, um Lesefehler bei der Sequenzierung oder nicht lesbaren Basen (N) auszugleichen (türkise Pfeile). Primer sollten nicht in Bereichen mit unsicheren Basen greifen. Da die flankierenden Regionen der Mikrosatelliten bei einigen Sequenzen sehr klein sind (C1, S8), war Nacheditieren notwendig, um überhaupt Primer erstellen zu können.

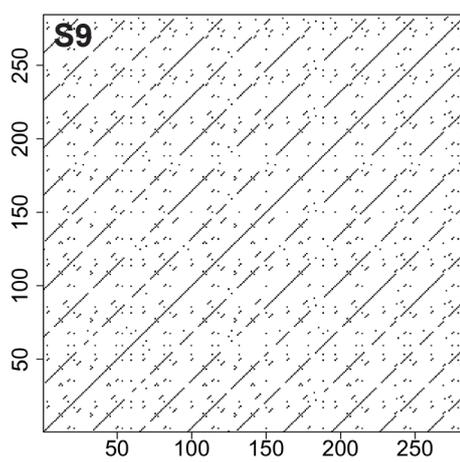
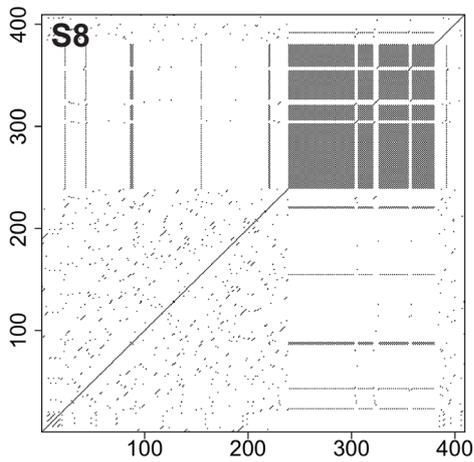
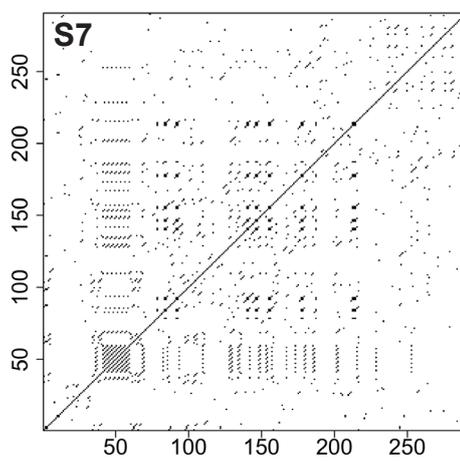
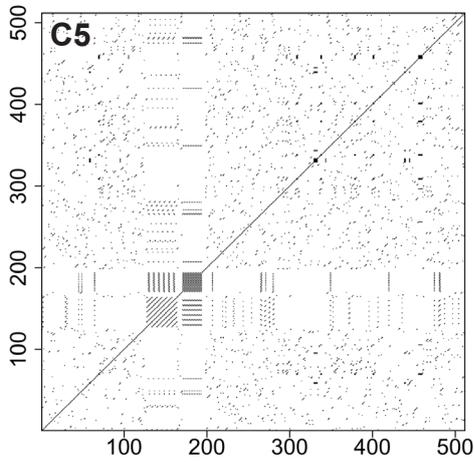
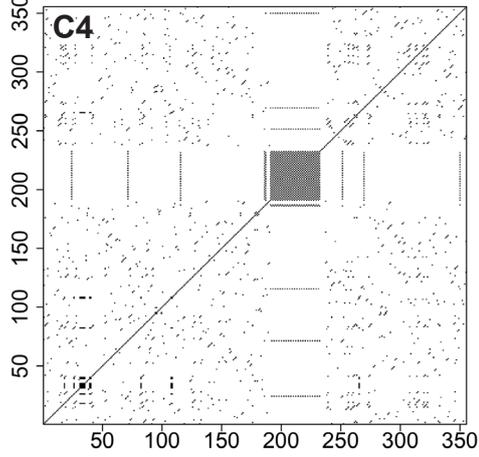
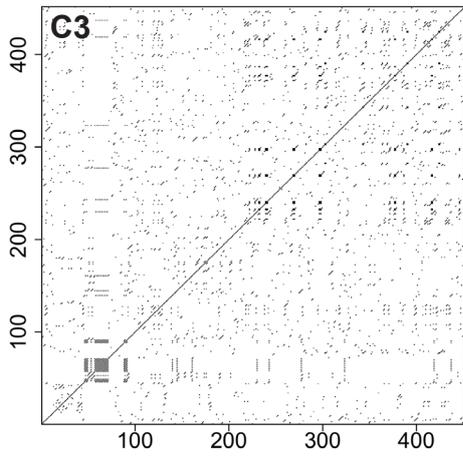
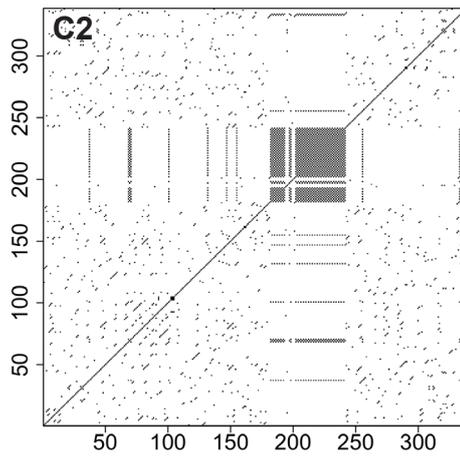
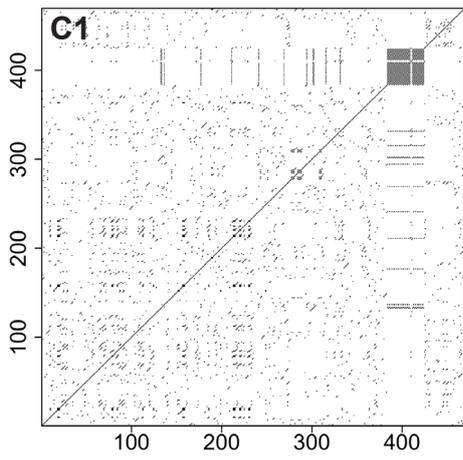


Abb. 13: Dotplot-Diagramme der Mikrosatellitenhaltigen Sequenzen. Erstellt mit R (*R Development Core Team* 2010) und dem Packet SequinR (CHARIF & LOBRY 2007). Parameter; `wsizer = 3`, `wstep = 1`, `nmatch = 3`

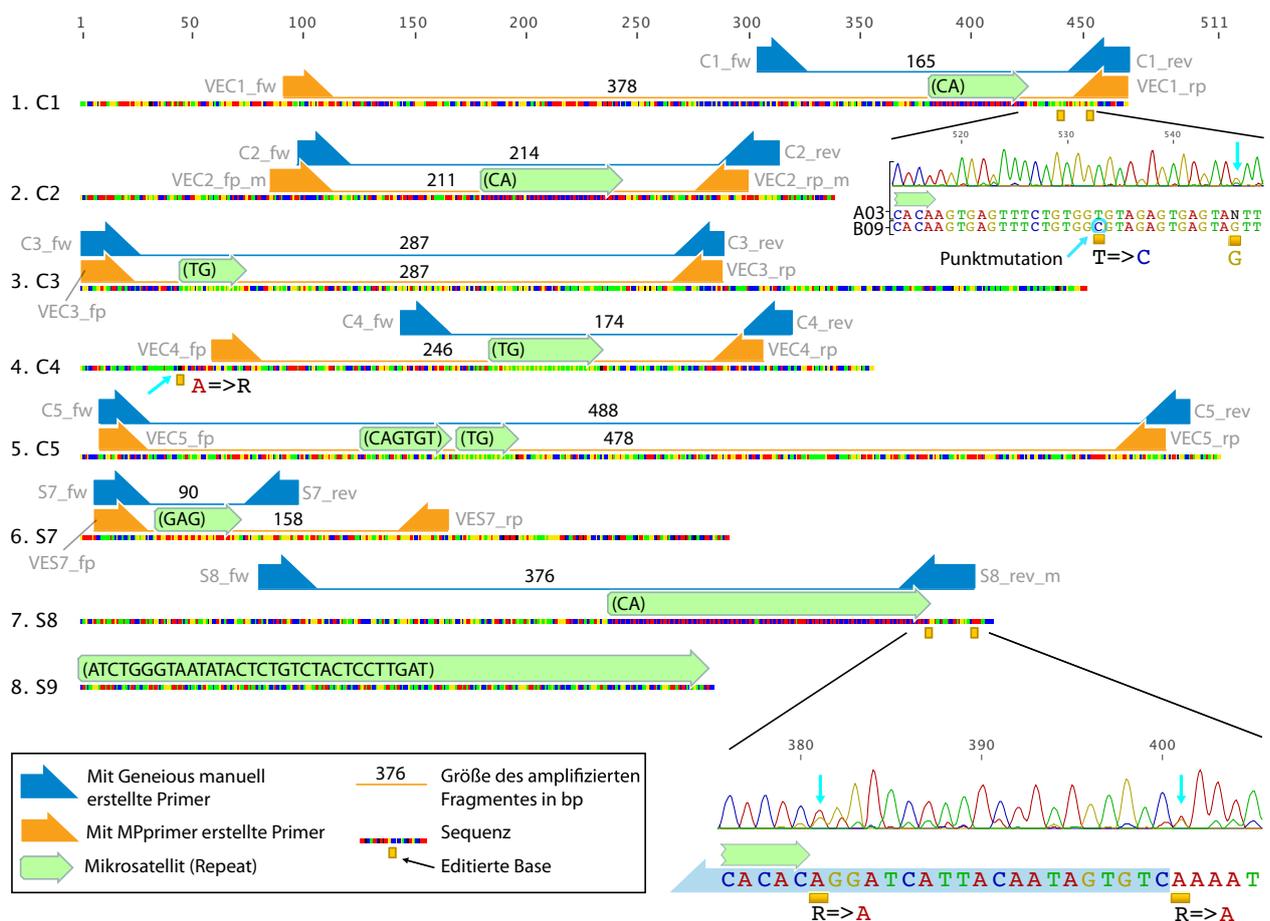


Abb. 14: Übersicht der entwickelten Primer sowie vereinzelte Anpassungen der Sequenzen (Türkise Pfeile).

Die über MPprimer und Geneious Pro erstellten Primer binden meist in sehr ähnlichen Sequenzbereichen, bzw. sind in einigen Fällen identisch (vgl. Abb. 14). Deutliche Unterschiede zeigten sich bei den Primern für die Sequenzen C1, C4 und S7. Zumindest in Sequenz C1 waren die erstellten Forward-Primer nicht identisch sein, da für das zu amplifizierende Fragment ein Größenbereich von 369 - 469 bp angegeben wurde (vgl. Tab. 12). Für den Minisatellit in Sequenz S9 liesen sich keine Primer erstellen, da die gesamte Sequenz aus Repeats besteht. S8 hatte eine zu kleine flankierende Region, welche zudem einen geringen GC-Gehalt aufwies. Der manuell erstellte Primer (S8_rev_m) wies zu schlechte Eigenschaften auf, daher wurde auf eine Herstellung verzichtet. In Tab. 8 sind die hergestellten Primer aufgelistet.

Die Primer VEC1_rp und VEC3_fp sind identisch. Daher wurde nur einer der beiden Primer hergestellt und in den PCR-Ansätzen für C1 und C3 verwendet. Mit weniger restriktiven Bedingungen war ein Alignment der Contigs C1 und C3 (als Reverse Compliment) möglich (vgl. Abb. 15). Die Contigs zeigten eine Basenübereinstimmung von knapp 75%. Die Primer VEC1_fw und VEC3_rp binden jedoch in Regionen, welche im Aligment einige Unterschiede zeigten. Dadurch sollte es möglich sein, dass die Primer zuverlässig binden und es nicht zu Kreuzamplifizierungen kommt.

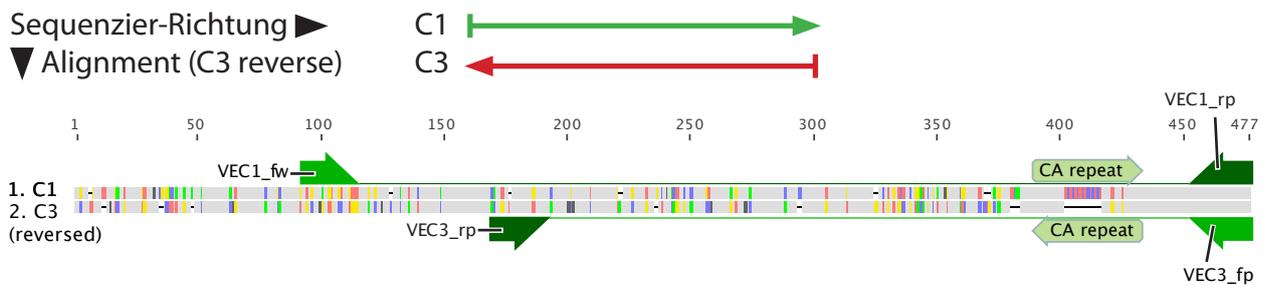


Abb. 15: Alignment der Sequenzen C1 und C3. Farbige Bereiche kennzeichnen nicht übereinstimmende Basen, '-' = Gaps (Geneious Pro Alignment mit Standard-Einstellungen).

3.3.4 Gradienten-PCR

In Abb. 16 sind ausgewählte Ergebnisse der Gradienten-PCR gezeigt. Die aus den Sequenzen S7, C1, C5 und C3 erstellten Primer amplifizierten über einen weiten Temperaturbereich (A). Die für die Sequenzen C2 und C4 erstellten Primer amplifizierten Fragmente, welche nicht im berechneten Zielbereich lagen (B) oder nur unzureichend amplifiziert wurden (C). Die mit den C2 Primern amplifizierten Fragmente lagen im 50 bp Bereich. Es wurden jedoch Amplifikate erwartet, welche < 200 bp sind (roter Pfeil). Die für die Sequenz C4 erstellten Primer zeigten nur in einem niedrigen Temperaturbereich deutliche Amplifikate (weiße Sterne). Bis zu einer Temperatur von 55,2 °C waren zudem schwache Banden zu erkennen.

3.3.5 Optimieren der Primer

Abb. 17 zeigt die mit den verschiedenen Primern amplifizierten Fragmente im Größenvergleich, bei einer Annealing-

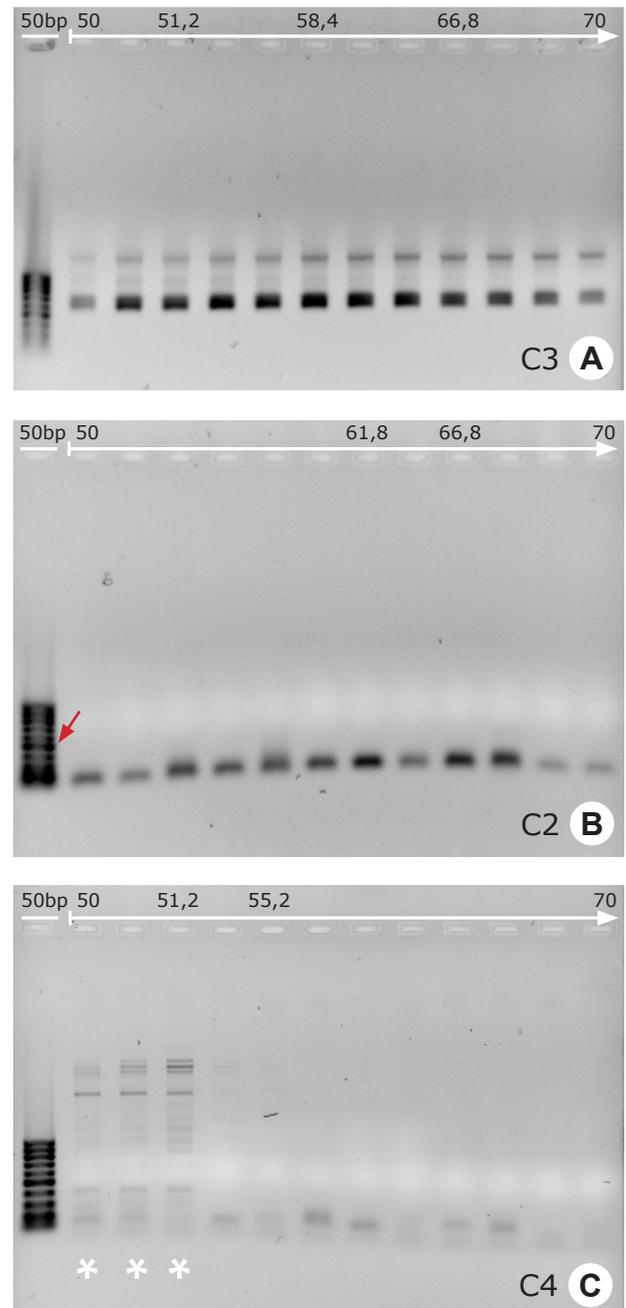


Abb. 16: Gradienten-PCR von 50 - 70 °C. Neben den Buchstaben ist die jeweilige Sequenz angegeben, für die entsprechende Primer erstellt wurden. Weitere Erläuterungen im Text.

Temperatur von 49°C und der DNA-Isolation von *M. saponariae* aus Hayingen. Die amplifizierten Fragmente entsprachen den erwartungsgemäßen Größen (vgl. Abb. 14). Die Primerpaare für C3 und C1 amplifizierten mehr als 2 Fragmente. Die Primerpaare für C2 und C4 zeigten, wie bereits in der Gradienten-PCR keinerlei Fragmente im erwarteten Größenbereich. Die Multiplex-PCR zeigte deutlich schwächere Banden als die Primer-Paare allein (vgl. Abb. 17 Gel-Tasche M).

In einem Test mit 3 weiteren DNA-Isolationen amplifizierten die Primerpaare für C1, C3, C5 und S7 ebenfalls erfolgreich Fragmente (Daten nicht gezeigt). Die entsprechenden Primer wurden um die M13-Sequenz erweitert, um eine Analyse von einer größeren Zahl Proben im LI-COR DNA Analyzer zu ermöglichen (vgl. 2.3.5). Die verlängerten Primer sind durch das Kürzel ‚M13‘ gekennzeichnet und im Anhang aufgeführt (vgl. Tab. 8).

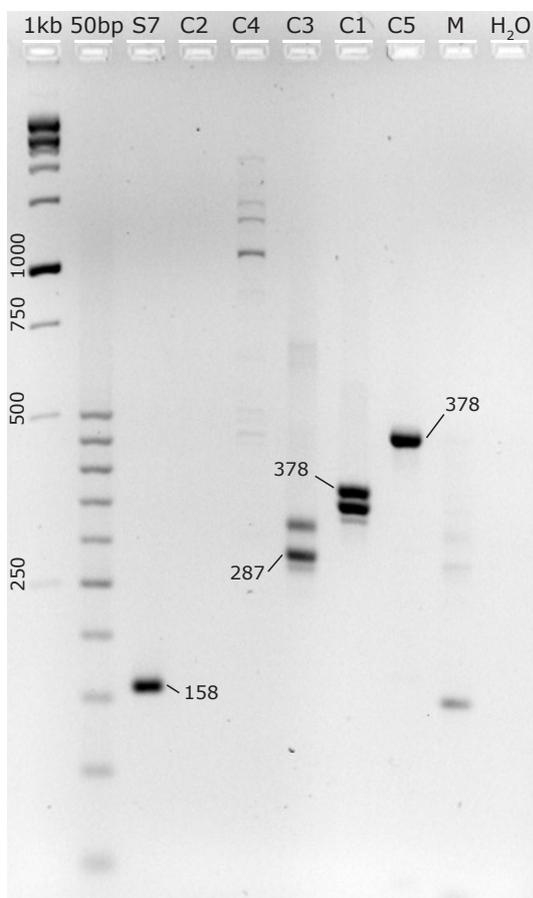


Abb. 17: Größenvergleich der amplifizierten Fragmente. Die Zahlen an den Fragmenten, gibt die erwartete Größe in bp wieder.

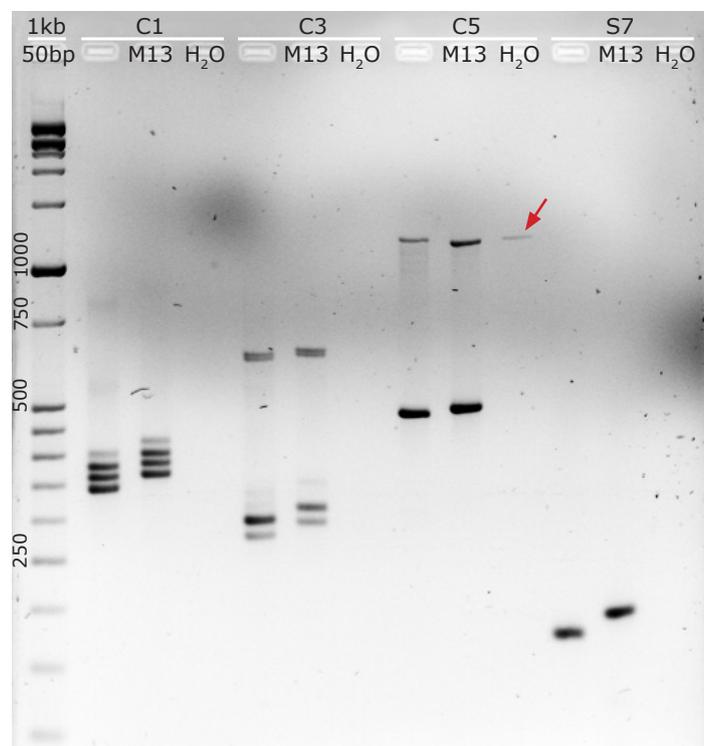


Abb. 18: Vergleich der Standard-Primer mit den um die M13-Sequenz verlängerten. DNA: Isolation KW22 Marbach, Annealing-Temperatur 52,5°C. Weitere Informationen im Text.

Eine detaillierte Aufschlüsselung über die verwendete DNA Isolationen und Herkunft der Organismen ist im Anhang in Tab. 9 zu finden.

Alle M13-verlängerten Primer amplifizierten erfolgreich (vgl. Abb. 18), obwohl ihre Überprüfung mit OligoCalc eventuelle Probleme mit Selfannealing und Hairpin-Bildung hervorbrachte (vgl. Tab. 15). Die Negativkontrolle vom Primerpaar für C5 zeigte eine deutliche Bande bei ca. 1,5 kB (roter Pfeil). Die drei Proben (vgl. Abb. 18 C5) wurden wiederholt und das Problem

trat nicht erneut auf.

3.3.6 Untersuchung von größeren Probenmengen (LI-COR DNA Analyzer)

Je Primerpaar wurden 19 Proben und eine Negativkontrolle getestet. Über Auftrennung der PCR-Produkte in einem Agarose-Gel, wurde der Erfolg der PCR überprüft. Abb. 19 zeigt das Gelbild der PCR-Produkte, welche mit dem Primerpaar für C3 amplifiziert wurden. Alle Proben zeigten Amplifikate bei ca. 320 bp. Zusätzlich zeigten 9 von 19 Proben eine zusätzliche Bande im Bereich

von ca. 350 bp (schwarze Sterne). Die PCR der Probe aus Berlin (AS452, roter Pfeil) ergab eine zusätzliche Bande im Bereich von ca. 300 bp. Auch mit den drei weiteren Primern wurden die meisten Proben erfolgreich amplifiziert. Vor der Analyse im LI-COR Gelanalyzer wurden die PCR-Produkte mit starken Banden bis zu 100 fach verdünnt. PCR-Produkte, welche im Gel keine sichtbaren Amplifikate zeigten, wurden unverdünnt verwendet (Daten nicht gezeigt).

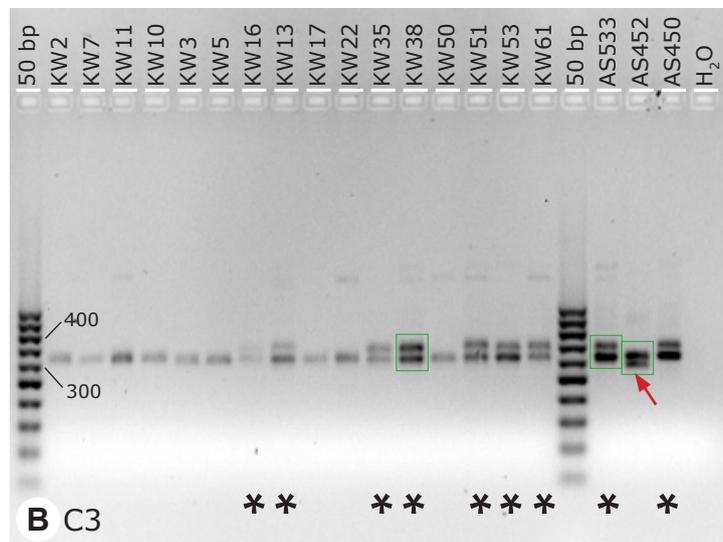


Abb. 19: Auftrennung des PCR Produktes mit Primer C3. Weitere Erleuterungen im Text.

Aufgrund von begrenzten technischen Ressourcen, wurde für jedes Primerpaar nur eine Analyse durchgeführt. Eine automatische Auswertung der Gele mit Saga 2 war aufgrund von zu starken Störfaktoren nicht möglich. Die verwendeten Acrylamid-Gele wurden zuvor mit anderen Proben beschickt, wodurch diese dunkler wurden und Artefakte im Gelbild zunahmen. Mit Saga 2 konnte nur die Größe der einzelnen Fragmente manuell abgeschätzt werden. Zur besseren Darstellung wurden die hier gezeigten Bilder um 75% in der Länge gestaucht (Photoshop; Bicubic sharper. Weitere Bearbeitung; invertieren und Kontrast, Farblevel und Helligkeit angepasst³).

Abb. 20 zeigt die Gelbilder der Elektrophorese im Acrylamid-Gel, mit den Primern C1, C3 und C5. Die gestrichelten orangenen Linien geben den Größenbereich unter Berücksichtigung der Gel-Artefakte wieder. Ausgehend von den deutlichen Amplifikaten (z.B. Abb. 20 B bei 306 bp),

³ Bei der Nachbearbeitung wurde versucht für die Printversion dieser Arbeit vorhandene Banden besser sichtbar zu machen. Die unverfälschten Originalbilder befinden sich auf der dieser Arbeit beiliegenden CD. Die Informationen in den hier gezeigten Bildern stimmen mit den Originalen überein.

wurden die entsprechenden abweichenden Banden mit ‚+‘ oder ‚-‘ und der Abweichung in bp vermerkt. Fehlende Banden (mögliche Nullallele) wurden durch ein ‚X‘ gekennzeichnet. Banden deren Auswertung nicht eindeutig war, sind durch ein ‚*‘ gekennzeichnet.

Die Isolationen AS533, AS452 und AS450 sind haploid (wurde über Amplifizieren der Paarungstypen getestet), alle anderen Kulturen sind diploid. Eine detaillierte Aufschlüsselung der Isolationen ist in Tab. 9 aufgeführt.

Die mit dem Primerpaar für C1 amplifizierten *Microbotryum*-Isolationen ergaben bis zu 4 deutliche Banden (bei 394, 380, 364 und 360 bp). Bei den auf *S. pumila* (blauer und grüner Balken) gesammelten Proben schienen bei 360 bp keine Amplifikate vorzuliegen. Desweiteren zeigten die *Microbotryum*-Aufsammlungen vom Wöllaner Nock (blauer Balken) sowie von der Hochalm Spitze (grüner Balken) innerhalb der jeweiligen Populationen keine Unterschiede. Jedoch zeigte die Population vom Wöllaner Nock zwei Banden die deutlich vom Durchschnitt abweichen. Die Aufsammlungen auf dem Wirt *S.*

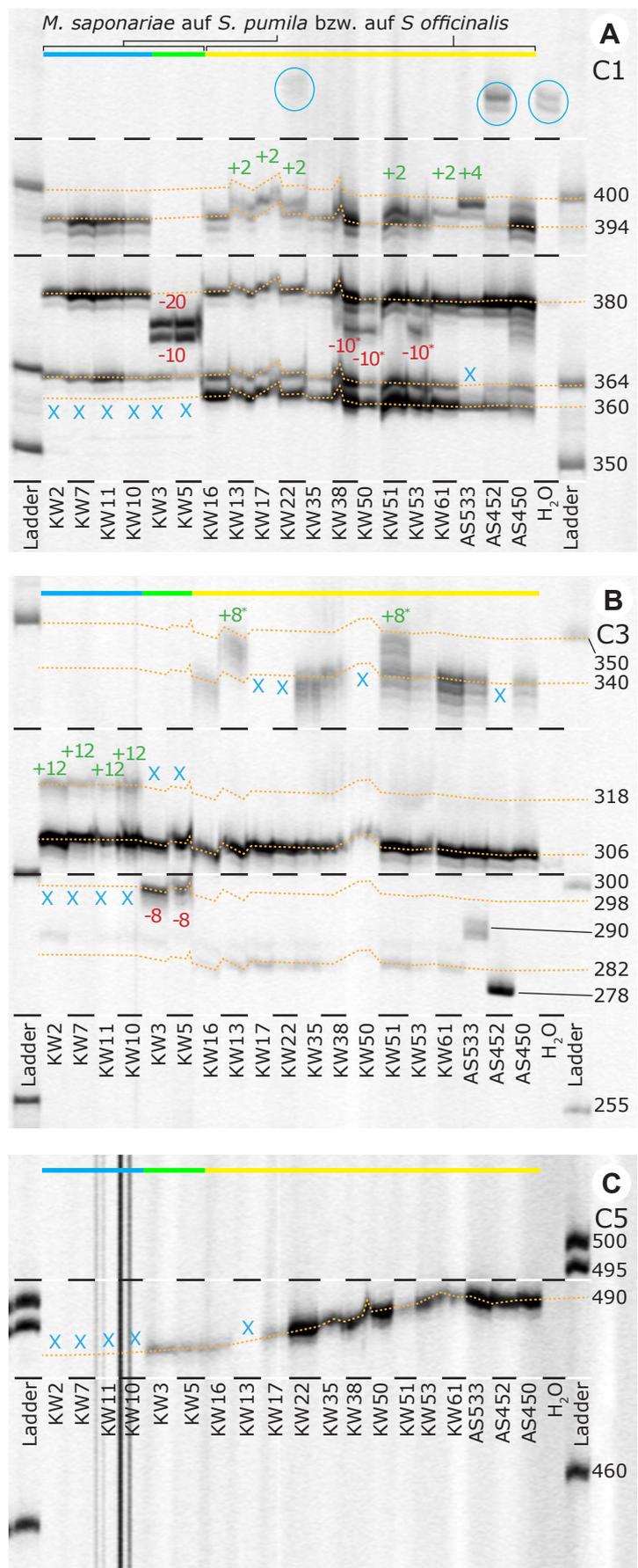


Abb. 20: Auftrennung der PCR-Produkte (Primer C1, C3, C4) über ein Acrylamit-Gel. Zahlen = Fragmentgröße in bp. Aufschlüsselung der Proben in Tab. 9. Weitere Erläuterungen im Text.

officinalis (gelber Balken) zeigten meist 4 Banden mit der selben Größe. Nur die Banden bei 394 bp zeigten eine leichte Variabilität um 2 bzw. 4 Nukleotide. Die Probe aus Hayingen zeigte keine Bande bei 364 bp. Im Bereich über 400 bp ergaben einzelne Proben eine zusätzliche Bande. Diese konnte jedoch nicht ausgewertet werden, da sie auch in der Negativkontrolle (H₂O) vorkommen. Die Negativkontrolle zeigte desweiteren eine sehr schwache Bande bei 380 bp.

Die mit Primerpaar für C3 amplifizierten Fragmente zeigten zwei deutliche Banden im Bereich von 306 und 340 bp. Die Aufsammlungen vom Wöllaner Nock zeigten eine zusätzliche Bande bei 318 bp, die der Hochalm Spitze eine zusätzliche Bande bei 298 bp. Die Aufsammlungen von *S. pumila* ergaben desweiteren keine Amplifikate bei 340 bp. In diesem Größenbereich fiel bei *S. officinalis*-Aufsammlungen eine leichte Variabilität in Form von Bandenausfällen und ca 8 bp größeren Amplifikaten auf. Diese leichte Variabilität deckte sich jedoch nicht mit den Mustern welche mit den Primern für C1 gefunden wurden. Bei der Probe aus Hayingen (AS533) trat eine zusätzliche Bande bei 282 bp auf. Außerdem waren bei vielen Proben schwache Banden im Bereich von 282 / 284 bp zu erkennen. Da sich bereits im Agarose-Gel die Banden bei 340 / 306 deutlich auftrennten, wurde

eine Sequenzierung ausgewählter Banden vorgenommen (vgl. 2.3.6). Die Grün umrandeten Banden in Abb. 19 wurden einzeln sequenziert. Die Banden bei 306 kb entsprachen, bis auf wenige Punktmutationen, dem Contig C3 mit denen die Primer entwickelt wurden (Mikrosatellit-Größe (CA)₁₄). Für die Banden bei 340 bp wurde ein Mikrosatellit mit (CA)₂₉ sequenziert. Die Sequenzierung war jedoch nach der Mikrosatelliten-Sequenz, aufgrund zu schlechter Sequenzqualität, nicht auswertbar. Auffällig war, dass die Sequenz, die den längeren Mikrosatelliten enthielt, im Gelbild mehr Stotterbanden zeigte, als die nur halb so große (vgl. Abb. 20). Die Bande bei 278 bp konnte nicht erfolgreich sequenziert werden.

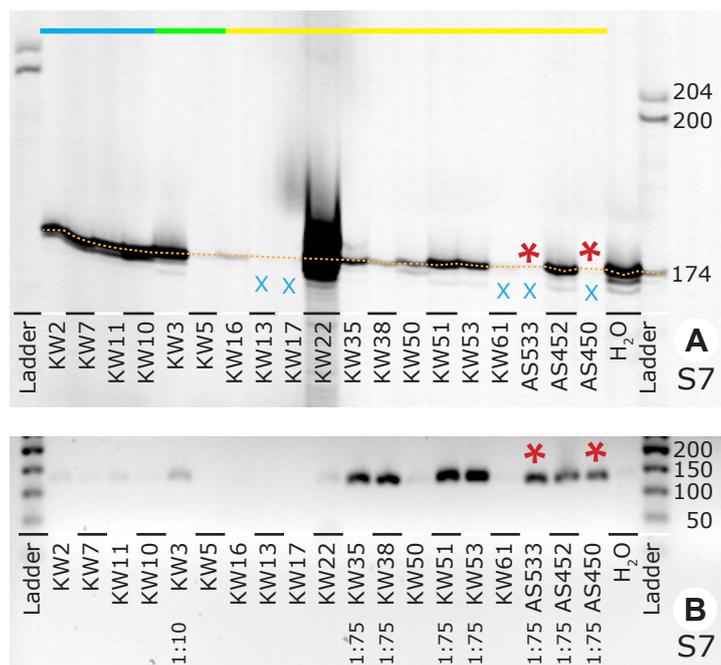


Abb. 21: **A** Auftrennung der PCR-Produkte (Primer S7) über ein Acrylamid-Gel. Zahlen = Fragmentgröße in bp. **B** Auftrennung im Agarose Gel und anschließende Verdünnung des PCR-Produktes für die Acrylamid-Auftrennung.

Aufschlüsselung der Proben in Tab. 9 im Anhang. Rote Sterne = Unstimmigkeiten zwischen den beiden Gelbildern. Weitere Erläuterungen im Text.

Abb. 20 (C) zeigt das Gelbild des Primerpaares für C5. Es ist deutlich zu erkennen, dass alle Banden der Proben im Größenbereich von 490 bp lagen. Bei Aufsammlungen von *M. saponariae* auf *S. pumila* von der Hochalmspitze (grüner Balken) waren in diesem Größenbereich keine Banden zu erkennen. Eine weitere Bande ist bei der Aufsammlung aus dem Ammertal (KW13) ausgefallen.

In Abb. 21 (A) ist das Ergebnis der PCR mit dem Primerpaar S7 dargestellt. Alle Banden lagen in einem Größenbereich von 174 bp. In 5 Proben wurden keine Banden amplifiziert. Ein Vergleich mit dem Agarose-Gel (B) zeigte, dass die Banden für die einzelnen Proben nicht in allen Fällen übereinstimmten (Rote Sterne). Zudem zeigte die Negativkontrolle eine deutliche Bande. Das PCR-Produkt mit Probe KW22 wurde zudem nicht ausreichend verdünnt. In der Wiederholung der PCR zeigte die Negativkontrolle erneut eine deutliche Bande. Anschließendes Prüfen der PCR-Chemikalien auf Kontamination mit DNA in weiteren PCR-Reaktionen zeigte, dass die PCR-Chemikalien DNA-frei sind. Dennoch konnte in der begrenzten Zeit das Problem nicht gelöst werden.

4. Diskussion

Ziel dieses Projektes war es, Mikrosatelliten-Marker als eine schnelle und kostengünstige Methode zu etablieren, mit welcher es eventuell möglich ist verschiedene *Microbotryum sapotariae*-Populationen zu unterscheiden. Abb. 22 gibt eine Übersicht die Anzahl der verfügbaren Sequenzen / Primer im Verlauf der verschiedenen Arbeitsschritte.

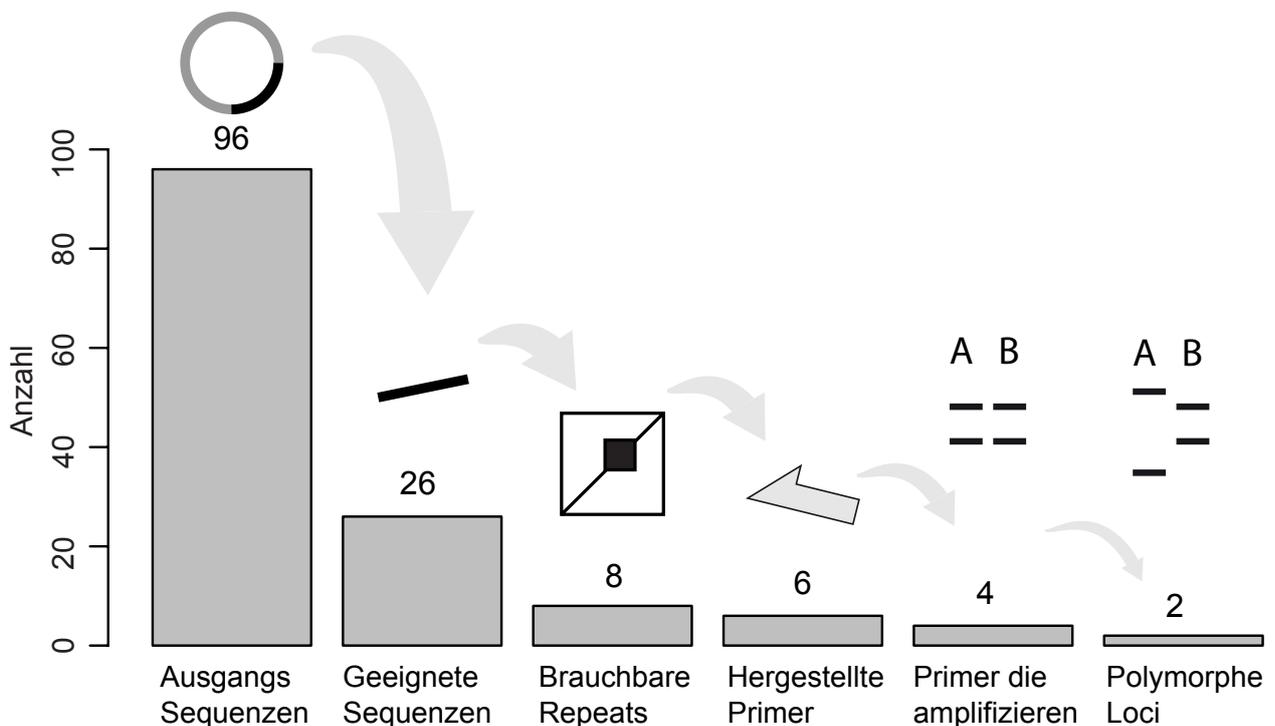


Abb. 22: Übersicht über die Sequenz-Datenbank und die einzelnen Arbeitsschritte.

4.1 Mikrosatelliten Anreicherung nach der Reporter-Genom-Methode

Von den knapp 96 Ausgangssequenzen waren 73% redundant (vgl. Abb. 22). Die 26 gebildeten Contigs bzw. Sequenzen enthielten nur 8 brauchbare Mikrosatelliten (31%). Die Anreicherung fiel im Vergleich zu LEESE et al. 2008 mit durchschnittlich über 85% Mikrosatelliten in den verschiedenen Sequenzen und deutlich weniger redundanten Sequenzen (12%), wesentlich schlechter aus.

Die geringe Ausbeute sowie die vielen redundanten Sequenzen sind dabei vermutlich auf technische Artefakte zurückzuführen. Der Abgleich der Sequenzen mit dem *Mus musculus*-Genom zeigt, dass die erhaltenen *Microbotryum*-Sequenzen an verschiedenen Stellen im Maus-Genom hybridisieren können (oft in nicht repetitiven Regionen). Durch zu schwaches Durchmischen des Hybridisierungsansatzes könnten viele Fragmente an Sequenzabschnitten ohne Mikrosatelliten hybridisiert haben. Auch eine Selektion von wenigen Mikrosatelliten durch die PCR vor der

Hybridisierung (vgl. Abb. 5) ist denkbar (aufgrund von wenig DNA-Template -> 40 PCR-Zyklen, pers. Kommunikation Dr. Florian Leese). Sollte an diesem Projekt weiter gearbeitet werden, bietet es sich an die Hybridisierung zu wiederholen.

Die Sequenzen aus Contig C1, von denen nur 36% Mikrosatelliten enthalten, könnten potentiell auch außerhalb des Mikrosatelliten mit dem Maus-Genom hybridisieren (vgl. Abb. 11 hell roter Balken bei ca. 200 bp). In den Fällen in denen die Fragmente keinen CA-Mikrosatelliten enthielten, ist eine Hybridisierung mit homologen Genbereichen wahrscheinlich. Jedoch konnte nicht genau bestimmt werden, an welchen Stellen tatsächlich Hybridisierungen mit homologen Repeats oder Genbereichen stattgefunden haben.

4.2 Entwicklung der Primer

Nachfolgend wird die manuelle Erstellung von Primern diskutiert, da die Erstellung von Primern über den automatisierten Weg nicht funktionierte (vgl. 2.3.2), . Es hat sich im Verlauf der Primerentwicklung gezeigt, dass Besonderheiten in Contigs und Sequenzen von vollautomatischen Programmen nicht erkannt werden konnten. Daher ist es grundsätzlich zu empfehlen, die Daten in den einzelnen Entwicklungsschritten zu überprüfen. Nachfolgend wird ein Weg diskutiert mit dem es möglich ist, Primer effizient und schnell zu erstellen. Trotz sehr viel Automatisierung ist so gleichzeitig Flexibilität gewährleistet.

4.2.1 Vorbereiten der Sequenzen (Vektor, Alignment, Suche nach Mikrosatelliten)

Ist eine ausreichend große, mit Mikrosatelliten angereicherte, Sequenz-Datenbank verfügbar, muss zunächst der Klonierungsvektor aus den Sequenzen entfernt werden. Danach wird ein Alignment durchgeführt, um mehrfach vorhandene Sequenzen zu erkennen. Es hat sich gezeigt, dass es für das Alignment wichtig ist den Klonierungsvektor zu entfernen, um die Sequenzen korrekt gruppieren zu können (vgl. Abb. 10).

Auch wenn Sequencher sehr zuverlässig Contigs erstellt, lohnt es sich diese manuell zu überprüfen. Je nachdem wie strikt die Vorgaben für das Alignment gewählt wurden, kann es zu falschen oder fehlenden Gruppierungen von Sequenzen kommen. In dieser Arbeit wurde erst im Verlauf der Primer-Tests festgestellt, dass Sequenzen für die Primerpaare C1 bzw. C3 sehr ähnlich sind (vgl. Abb. 15). Andererseits kommt es bei zu weniger strikten Einstellungen zur Gruppierung von Sequenzen, welche nur geringe Unterschiede zeigen (vgl. Abb. 11). Es ist daher zu empfehlen ein Alignment mit 85% mismatch durchzuführen und anschließend mit einem weniger stringenten

Alignment (min match 60%, min overlap 100 bp) zu prüfen, ob weitere Sequenzen in Contigs zusammengefasst werden können.

Die Suche nach Mikrosatelliten funktioniert sowohl mit Geneious Pro Dotplots (Abb. 13) als auch mit dem Phobos-Modul sehr zuverlässig. Da mit beiden Methoden die gleichen Mikrosatelliten gefunden wurden, ist die Suche über das Phobos-Modul zu bevorzugen, da hierbei die Mikrosatelliten vollautomatisch gefunden und zusätzlich ihre Eigenschaften ermittelt werden. Aufgrund der Einstellungen des Phobos-Algorithmus kann es jedoch zu ‚unvollständigen‘ Annotationen kommen (vgl. Abb. 12). Weniger strikte Vorgaben waren nicht immer sinnvoll, da viele zu kleine oder imperfekte Mikrosatelliten gefunden würden, welche sich als molekulare Marker nicht eignen (DUTECH et al. 2007). Die gefundenen Mikrosatelliten sollten daher immer manuell überprüft werden. Je nach Ausgangsdatensatz und Häufigkeit von geeigneten Mikrosatelliten, sollten die Suchparameter angepasst werden. Da der in dieser Arbeit verwendete Datensatz nur wenige Sequenzen mit Mikrosatelliten enthielt (vgl. Abb. 22), wurde versucht für alle gefundenen Repeats Primer zu erstellen.

4.2.2 Entwicklung und Optimierung der Primer

Die optimalen Parameter für die Primer-Entwicklung zu finden, gestaltete sich aufgrund der vielen, teils widersprüchlichen Meinungen, als schwierig (vgl. Tab. 1, HENEGARIU et al. 1997, RÖMPLER et al. 2006, SHEN et al. 2010, MÜLHARDT 2009). Um die Tauglichkeit der Primer zu prüfen, wurde daher ein Primertest durchgeführt.

Für die Primer-Erstellung wurden zwei verschiedene Ansätze getestet. Zum einen wurden Multiplex-Primer für die Amplifikation in einer PCR-Reaktion erstellt, zum anderen wurden Primer manuell erstellt. Da sowohl MPprimer als auch Geneious Pro das Modul Primer3 zum Erstellen der Primer verwenden, sind die meisten erstellten Primer sehr ähnlich. Die gefundenen Unterschiede in den Primern sind dabei vermutlich durch die verschieden angegebenen optimalen Primerlängen bei der Erstellung zu erklären. Um die Möglichkeit zu haben Primer in Multiplex-PCRs einzusetzen, wurden die von MPprimer erstellten Primer hergestellt. Jedoch funktionierten die Multiplex-Primer nicht wie erwartet, wenn sie in einer PCR-Reaktion kombiniert wurden (vgl. Abb. 14 Tasche M). Zudem amplifizieren einige Primer verschieden große Fragmente, wodurch sich die Banden im Gel überlagern können. Der Einsatz von Multiplex-PCRs müsste noch weiter untersucht werden. Das Programm MPprimer befindet sich jedoch noch in der Entwicklung und momentan ist es nicht möglich den optimalen Größenbereich der Amplifikate automatisch zu berechnen. Dies wäre jedoch wichtig, damit die Banden im Gel weit voneinander entfernt sind

(Rücksprache mit Entwicklern). Es ist nötig für jede Sequenz einen Größenbereich zu definieren (vgl. Tab. 12), in dem das amplifizierte Fragment liegt, was das Erstellen von Primern sehr unkomfortabel macht. Es wird daher empfohlen die Primer in zukünftigen Projekten mit Geneious Pro zu erstellen. Wenn dabei auf gleiche Annealing-Temperaturen geachtet wird, können mit Geneious Pro gleichwertige Primer erstellt werden, welche alle mit dem gleichen PCR-Programm verwendet werden können.

Die Primerpaare, die zuverlässig amplifizierten (C1, C3, C5 und S7), wurden für die Analyse der 19 Aufsammlungen verwendet. Durch die dafür nötige Verlängerung der entsprechenden Primer um die M13-Sequenz, bewegten sich die Amplifikate langsamer im Gel (vgl. Abb. 18).

Um ein möglichst spezifisches Binden der Primer zu erreichen, wurde eine Annealing-Temperatur von 55°C verwendet. Da im Acrylamid-Gel schon schwache Amplifikationen als Bande sichtbar sind, sollte so versucht werden unspezifische Produkte zu vermeiden (HENEGARIU et al. 1997, MÜLHARDT 2009). Da dennoch unspezifische Banden in den Gelbildern sichtbar waren (vgl. Abb. 20 A bei 350 bp, B bei 282 bp), sollten die Annealing-Temperaturen eventuell auf über 55°C erhöht werden. Höhere Temperaturen, welche in der Gradienten-PCR noch deutliche Amplifikate zeigten (vgl. Abb. 16), konnten jedoch, aufgrund des begrenzten zeitlichen Rahmens, nicht mehr getestet werden. Im Laufe der Analysen zeigte sich zudem, dass die amplifizierten Fragmente zu groß sind. In Zukunft hergestellte Mikrosatelliten-Primer sollen so gewählt werden, dass die amplifizierten Fragmente maximal 300 bp groß sind und so deutlichere Banden im Gel zeigen.

4.3 Auswertung der Acrylamid-Gele

Bei der Auswertung der Acrylamid-Gele gab es zwei Probleme. Zum einen wurde, aufgrund der begrenzten zeitlichen Ressourcen, jede PCR mit den entsprechenden Proben bzw. Primern nur einmal durchgeführt, wodurch die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse nicht getestet wurde. Zum anderen wurden die Gele zuvor mit anderen Proben beschickt, wodurch Artefakte im Gel zunahmten (vgl. Abb. 20 und Abb. 21). Da es sich bei schwierig zu analysierenden Banden um Artefakte handeln könnte, ist eine genaue Typisierung auf einzelne Loci und eine Zuordnung von Allelen nicht in allen Fällen möglich. Jedoch ist es gelungen einige Hypothesen mit weiteren molekularen Methoden und Auswertungen zu unterstützen.

4.3.1 Wenig variable Loci (Primer C5 und S7)

In den Gelbildern für die Primerpaare für C5 und S7 zeigten die Proben nur sehr geringe Variabilität (vgl. Abb. 20 C und Abb. 21 A). Mit dem Primerpaar C5 wird ein Fragment bei 490 bp amplifiziert, welches über ein Allel verfügt. Auffällig war, dass alle Proben vom Wöllaner Nock keine Amplifikate zeigten. Da dies bei allen vier Aufsammlungen der Fall war, kann hier ein Nullallel vermutet werden. Die Probe aus dem Ammertal (KW13) zeigte ebenfalls keine Bande, jedoch war keine Analyse möglich, da es sich auch um einen Artefakt handeln könnte. Zwischen haploiden und diploiden Kulturen wurde kein Unterschied festgestellt.

Beim Testen von Primerpaar für S7, waren deutliche Probleme mit der Wasserprobe, sowie der Analyse der PCR-Produkte mit dem Gel Analyzer aufgetreten (vgl. Abb. 21 rote Sterne). Die Banden im Agarose-Gelbild, zum Bestimmen der nötigen Vorverdünnungen (A) wichen deutlich von denen im Acrylamidgel (B) ab. Hier sind Fehler beim Auftragen oder Verdünnen der PCR-Produkte denkbar. Dennoch zeigte sich, dass Primerpaar für S7 einen Locus bei 174 bp amplifiziert, dessen Allele bei allen Proben gleich groß waren. Eine weitergehende Analyse der ausgefallenen Banden war aufgrund der Unstimmigkeiten in den Gelbildern (Abb. 21 A und B) nicht möglich.

Die geringe Variabilität in diesen Loci könnte mit den Motiven der Mikrosatelliten zusammenhängen (C5: (CAGTGT)_{6,5} und (TG)₁₃ und S7: (GAG)₇ vgl. Abb. 13 und Tab. 7), da mit zunehmender Motivlänge, sowie bei wenigen Repeats, die Häufigkeit von replication slippage abnimmt (PUPKO & GRAUR 1999, ELLEGREN 2004).

4.3.2 Variable Loci zwischen Populationen (C1 und C3)

Die Gelbilder der Primern C1 und C3 zeigten mehr Banden als für einen homologen Locus erwartet, da auch die haploiden *Microbotryum*-Aufsammlungen (AS) zwei oder mehr Banden zeigten. Es sprechen mehrere Indizien dafür, dass es sich um paraloge Loci handeln könnte, welche durch Genduplikationen entstanden sind.

Wie in Abb. 11 zu erkennen ist, lässt sich das Contig C1 in drei ähnliche DNA Sequenzen aufteilen. Es kann sich somit nicht um einen Locus mit zwei Allelen handeln. Auch Substitutionen von Basen bei der PCR sind weitgehend auszuschließen, da identische Sequenzen mindestens in doppelter Ausführung vorlagen. Es zeigten sich zwar einige Substitutionen in einzelnen Sequenzen, jedoch lassen sich deutlich drei Allele erkennen.

Eine weitere Analyse der Consensus-Sequenzen mit denen Primerpaar für C1 und C3 erstellt

wurden zeigte, dass auch hier eine Überschneidung der Sequenzen vorhanden ist. Jedoch zeigten die beiden Sequenzen im Contig deutliche Unterschiede (vgl. Abb. 15). Nach den Mikrosatelliten (5' Ende) waren beide Sequenzen vollkommen identisch, was den Einsatz desselben Primers ermöglicht (VEC1_rp und VEC3_fp sind identisch). Dass dieser homologe Bereich durch Artefakte in der PCR, wie z.B. *in vitro* Crossing-over (MEYERHANS et al. 1990, LAHR & KATZ 2009) entstanden ist, konnte ausgeschlossen werden, da es sich bei den Sequenzen C1 und C3 um Contigs aus elf bzw. drei Einzelsequenzen handelt. *In vitro*-Artefakte hätten also mehrmals an der identischen Stelle auftreten müssen.

Bei der Analyse der Acrylamid-Gelbilder fällt auf, dass die Aufsammlungen von *M. saponariae* auf *S. pumila* von der Hochalmspitze und dem Wöllaner Nock deutlich vom Bandenmuster der Aufsammlungen von *Microbotryum* auf *S. officinalis* wichen (vgl. Abb. 20 A und B). Innerhalb der Population zeigten die beiden Aufsammlungen vollkommen identische Amplifikatgrößen. Die Aufsammlungen auf *S. officinalis* zeigten ebenfalls konstante Banden, welche sich jedoch kaum zwischen Populationen unterschieden.

Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die Primer eine Unterscheidung der *Microbotryum*-Arten auf den zwei verschiedenen Wirten ermöglichen. Ob diese Unterscheidung mit allen *M. saponariae*-Populationen auf *S. pumila* möglich ist und ob die deutlichen Unterschiede zwischen den beiden Aufsammlungen (Hochalmspitze und Wöllaner Nock) für eine Unterscheidung auf Populationsebene ausreichen, muss mit einer deutlich größeren Zahl von Populationen bzw. Individuen getestet werden. Die geringen Variationen zwischen den auf *S. officinalis* gesammelten *Microbotryum*-Proben, deuten darauf hin, dass auch zwischen einzelnen Populationen auf *S. officinalis* Unterscheidungen möglich sein könnten. Jedoch sind hier die Daten nicht valide genug, weshalb entsprechende PCRs wiederholt bzw. weitere Mikrosatelliten-Primer entwickelt und getestet werden sollten.

Die Primerpaare für C3 zeigten mit den getesteten Isolationen ein Bandenmuster, welches für homo- bzw. heterozygote Organismen sprechen würde (vgl. Abb. 20 B). Auch die Sequenzierung ausgewählter Banden (vgl. Abb. 19 grüne Kästen) deutete darauf hin, dass es sich bei den Banden um verschiedene Allele eines Locus handelt. Dagegen spricht, dass die Probe aus Hayingen (AS533) drei Banden zeigt, obwohl die AS-Isolationen haploid sein müssten. Bevor hier Hypothesen aufgestellt werden können, müssen die entsprechenden PCRs wiederholt werden, um Artefakte auszuschließen. Auch ein Test mit DNA-Isolationen welche sicherlich haploid sind, wäre sinnvoll.

Die mit den Primern C1 amplifizierten Proben zeigen mehrere Banden. Hier ist es sehr wahrscheinlich, dass es sich aufgrund der verschiedenen sehr ähnlichen Sequenzen im Contig, um

paralogue Loci handelt (vgl. Abb. 11). Um sicher zu gehen, dass dies der Fall ist, müssten entsprechende Banden sequenziert werden. Da die Banden im Agarose-Gel dicht zusammen liegen, ist dafür eventuell der Umweg über die Klonierung in *E. coli* und anschließende Sequenzierung nötig.

4.4 Populationsstruktur von *M. saponariae* und mögliche Gen-Duplikationen bzw. Gen-Kluster / Ausblick

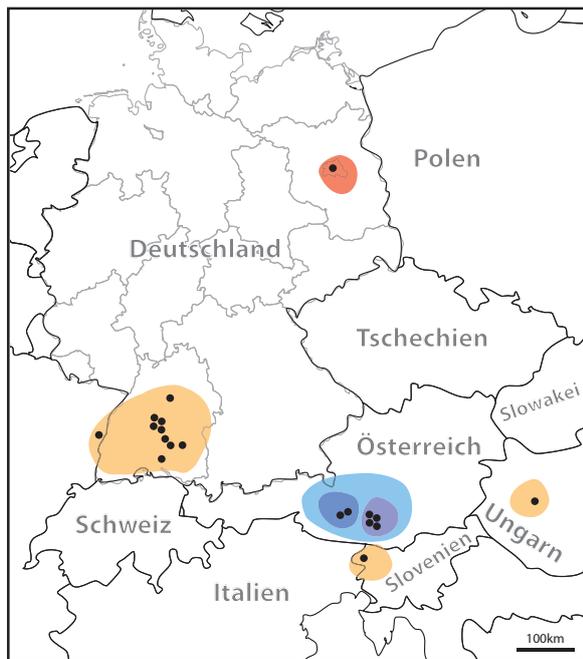


Abb. 23: Hypothetische biogeographische Verteilung. Weitere Erläuterungen im Text.

Abb. 23 zeigt die vorläufige Gruppierung von *M. saponariae* in verschiedene Populationen, welche aufgrund der vorliegenden Arbeit postuliert wurden. Populationen welche unterschieden bzw. zusammengefasst werden könnten, sind farblich hinterlegt. Die Aufsammlungen aus Baden-Württemberg zeigen eine geringe Variabilität in einigen Markern.

In dieser Arbeit wird deutlich gezeigt, dass sich Populationen von *M. saponariae* über Mikrosatelliten unterscheiden lassen. Die gefundenen polymorphen Mikrosatelliten reichen jedoch nicht aus, um verlässliche

Aussagen über Populationen zu treffen. Über eine wiederholte Gewinnung von Mikrosatelliten enthaltenden Sequenzen über die Reporter-Genom-Methode (LEESE et al. 2008, vgl. 2.2), sollten weitere Primer entwickelt werden. Außerdem könnte versucht werden für die Mikrosatelliten, welche nicht amplifiziert wurden, neue Primer zu entwickeln. Da diese Mikrosatelliten noch länger sind als die getesteten, welche zuverlässig funktionieren, könnten hiermit deutlichere Unterschiede zwischen den Populationen aufgezeigt werden (vgl. Abb. 13 C2 & C4). Zudem zeigt der gefundene Mikrosatellit mit über 70 AC-Repeats (vgl. Abb. 13 S8), dass das Genom von *M. saponariae* Mikrosatelliten enthält, die für Populationsstudien geeignet sind (ELLEGREN 2004, SELKOE & TOONEN 2006).

Sollte es gelingen zusätzliche mikrosatellitenhaltige Sequenzen anzureichern, könnten weitere Mikrosatelliten-Primer entwickelt werden. Dennoch sollte darüber nachgedacht werden, auch alternative Methoden wie z.B. AFLP zu testen, um mit Mikrosatelliten erhaltene Ergebnisse zu verifizieren und zu prüfen, ob andere Methoden potentiell eine bessere Auflösung von

Populationen bieten. Mit AFLPs könnte zudem überprüft werden wie variabel Populationen sind und sich der Einsatz von Mikrosatelliten-Markern lohnt (DUTECH, et al. 2007)

Die Hypothese, dass es sich bei den Contigs C1 und C3 um paraloge Loci handelt, sollte mit neuen Primern bzw. über Sequenzierung überprüft werden. Je nachdem, wie die Duplikation entstanden ist, können die paralogen Loci auf verschiedene Bereiche im Genom verteilt sein (springende Gene) oder alle in einem kurzen Sequenzbereich vorkommen (z.B. Crossing-over) (CAMPBELL & REECE 2005). Abb. 24 zeigt wie das Genfamilie möglicherweise entstanden ist. Aufgrund der verfügbaren Daten ist davon auszu-

gehen, dass Contig C3 und C1 durch Duplikation entstanden sind. Contig C1 besteht aus mehreren Sequenzen, die vermutlich aus relativ jungen Duplikationsereignissen hervorgehen.

Des weiteren sollte versucht werden, weitere *M. saponariae*-Proben auf *S. pumila* zu sammeln um eine genaue Auflösung über die Dynamik der Mikrosatelliten zwischen diesen Populationen zu erhalten.

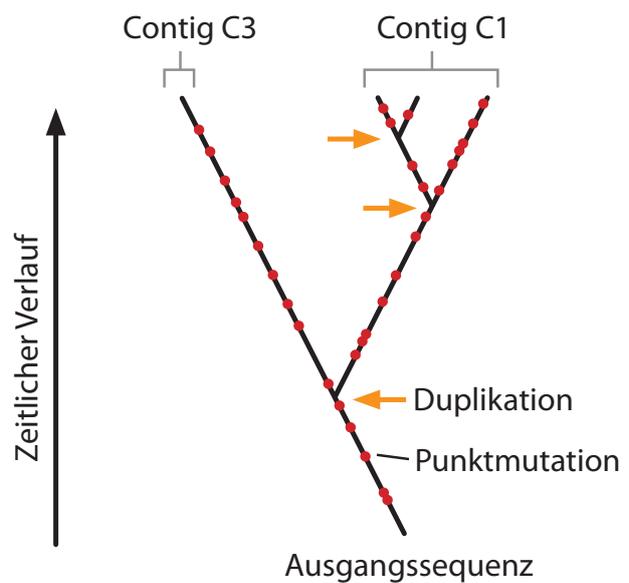


Abb. 24: Mögliche evolutionäre Entstehung der paralogen Loci. Weite Erläuterungen im Text.

5. Zusammenfassung / Abstract

5.1 Zusammenfassung

Ziel dieses Projektes war es, Mikrosatelliten-Marker als eine schnelle und kostengünstige Methode zu etablieren, mit welcher es eventuell möglich ist verschiedene *Microbotryum saponariae*-Populationen zu unterscheiden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Programme und Herangehensweisen getestet um Sequenzen vorzubereiten, Mikrosatelliten zu finden und Primer zu entwickeln. Es konnte ein effizientes Verfahren entwickelt werden, welches die notwendigen Arbeitsschritte weitgehend automatisiert, aber gleichzeitig hohe Flexibilität gewährleistet. Die Datensätze können in jedem Arbeitsschritt auf Besonderheiten überprüft werden und die Vorgehensweise entsprechend angepasst werden.

Mit den so entwickelten Primern konnte für 2 Loci gezeigt werden, dass die untersuchten *Microbotryum*-Populationen auf den Wirten *S. pumila* und *S. officinalis* voneinander unterschieden werden können. Die auf *S. pumila* gesammelten *Microbotryum*-Proben zeigen innerhalb ihrer Populationen keine Unterschiede. Zwischen den einzelnen Populationen (vom Wöllaner Nock bzw. der Hochalmspitze) sind die Unterschiede jedoch sehr deutlich. Die Aufsammlungen von *Microbotryum* auf *S. officinalis* zeigen nur eine geringe Variabilität, wodurch zwischen den Populationen keine Unterscheidung möglich war. Um verschiedene Populationen sicher zu unterscheiden, sind noch weitere Mikrosatelliten-Primer notwendig. Zudem werden weitere Aufsammlungen von *S. pumila* benötigt, um die in Zukunft entwickelten Primer zuverlässiger testen zu können. Die in dieser Arbeit entwickelten Herangehensweisen könnten dabei sehr nützlich sein.

Die Ergebnisse dieser Arbeit werfen jedoch auch neue spannende Fragen auf. Eventuell wurde ein mikrosatellitenhaltiger Sequenzfamilie gefunden, welche vermutlich durch Sequenz-Duplikationen entstanden ist. Die Entstehung und Struktur dieser Sequenzen sollte weiter erforscht werden.

Die Arbeit zeigt, dass die Unterscheidung von *Microbotryum* über Mikrosatelliten ein sehr vielversprechender Ansatz ist, um populationsbiologische Fragestellungen in dieser Gruppe von Pflanzenparasiten zu beantworten.

5.2 Abstract

The aim of this study was to establish the use of microsatellite markers as a potential method to distinguishing between different *Microbotryum saponariae* populations. Within the scope of this study we tested different approaches and programs for sequence processing, microsatellite identification, and primer development. An efficient method was established, which allows high flexibility in a semi-automatic work processes. The data set is accessible in every step and can be screened for anomalies. Therefore, if necessary the procedure can be adapted at any time.

Differentiation of the analysed *Microbotryum* populations on the hosts *S. pumila* and *S. officinalis* was possible with the developed primers. Furthermore, the *Microbotryum* samples collected on *S. pumila*, showed no differences within each of the populations, but the populations could be distinguished by the use of microsatellites. On the other hand the samples of *Microbotryum* on *S. officinalis* showed only little differences in the band patterns and where therefore not able to differentiate between populations for further studies. Therefore additional polymorphic loci are required. For future studies further samples of *Microbotryum* on *S. pumila* are needed, in order to allow reliable primer testing. The approach developed in this project, will be of use for additional research.

The results also raise new questions. Multiple microsatellite containing genes were found, that possibly arised from gene duplications. Further research is needed in order to get a better picture of their structure.

This project underlines, that the approach of distinguishing *Microbotryum* populations by the use of microsatellite markers has high potential, to help understanding the population structure in this group of plant parasites.

6. Abkürzungsverzeichnis

AFLP	amplified fragment-length polymorphism
C	Contig
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ITS	internal transcribed spacers
LSU	large subunit
MS	Mikrosatellit(en)
PCR	polymerase chain reaction
RAPD	randomly amplified polymorphic DNA
RFLP	restriction fragment length polymorphism
RUB	Ruhr-Universität Bochum
S	Sequenz
SSU	small subunit
TBE	Tris / Borate / EDTA
TE	Tris-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
T _m	Schmelztemperatur
VE	vollentionisiert
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
kb	Kilobase(n)
l	Liter
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
ng	Nanogramm
rDNA	Ribosomale Desoxyribonukleinsäure
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
∞	unendlich / unbegrenzt

7. Literaturverzeichnis

- Anderson and Cairney** (2004). Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. *Environ Microbiol* vol. 6 (8) pp. 769-79
- Altschul, Madden, Schäffer, Zhang, Zhang, Miller and Lipman** (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* vol. 25 (17) pp. 3389-402
- Buschiazzo and Gemmell** (2006). The rise, fall and renaissance of microsatellites in eukaryotic genomes. *Bioessays* vol. 28 (10) pp. 1040-50
- Bensch and Åkesson** (2005). Ten years of AFLP in ecology and evolution: why so few animals?. *Mol Ecol*
- Bernasconi, Antonovics, Biere, Charlesworth, Delph, Filatov, Giraud, Hood, Marais, McCauley, Pannell, Shykoff, Vyskot, Wolfe and Widmer** (2009). *Silene* as a model system in ecology and evolution. *Heredity* vol. 103 (1) pp. 5-14
- Campbell and Reece** (2005). *Biology*. Seventh Edition, Perason
- Charif and Lobry** (2007). SeqinR 1.0-2: a contributed package to the R project for statistical computing devoted to biological sequences retrieval and analysis. In: *Structural approaches to sequence evolution: Molecules, networks, populations* (Bastolla, Porto, Roman and Vendruscolo) pp. 207-232 Springer Verlag, New York
- Chase and Fay** (2009). Ecology. Barcoding of plants and fungi. *Science* vol. 325 (5941) pp. 682-3
- Day and Garber** (1988). *Ustilago violacea*, anther smut of the Caryophyllaceae. *Advances in plant pathology* vol. 6 pp. 457 - 482
- Drummond, Ashton, Cheung, Heled, Kearse, Moir, Stones-Havas, Thierer and Wilson** (2009) *Geneious Pro v4.8.5* <geneious.com>
- Dutech, Enjalbert, Fournier, Delmotte, Barrès, Carlier, Tharreau and Giraud** (2007). Challenges of microsatellite isolation in fungi. *Fungal Genet Biol* vol. 44 (10) pp. 933-49
- Ellegren** (2002). Microsatellite evolution: a battle between replication slippage and point mutation. *TRENDS in Genetics* vol. 18 (2) pp. 70
- Ellegren** (2004). Microsatellites: Simple sequences with complex evolution. *Nat Rev Genet* vol. 5 (6) pp. 435-445
- Henegariu, Heerema, Dlouhy, Vance and Vogt** (1997). Multiplex PCR: Critical parameters and step-by-step protocol. *BioTechniques* vol. 23 (3) pp. 504-511
- Hoffman and Winston** (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* vol. 57 (2-3) pp. 267-72.
- Held and Leese** (2007). The utility of fast evolving molecular markers for studying speciation in the Antarctic benthos. *Polar Biology* vol. 30 (4) pp. 513-521
- Kraemer, Beszteri, Gäbler-Schwarz, Held, Leese, Mayer, Pöhlmann and Frickenhaus** (2009). STAMP: Extensions to the STADEN sequence analysis package for high throughput interactive microsatellite marker design. *BMC Bioinformatics* vol. 10 pp. 41
- Kibbe** (2007). OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res* vol. 35 pp. W43-W46
- Lahr and Katz** (2009). Reducing the impact of PCR-mediated recombination in molecular evolution and environmental studies using a new-generation high-fidelity DNA polymerase. *BioTechniques* vol. 47 (4) pp. 857
- Levinson and Gutman** (1987). Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol Biol Evol* vol. 4 (3) pp. 203-21

- López-Villavicencio, Jono, Coantic, Hood, Enjalbert and Giraud** (2007). Multiple infections by the anther smut pathogen are frequent and involve related strains. *PLoS Pathog* vol. 3 (11) pp. e176
- Lutz, Göker, Piatek, Kemler and Begerow** (2005). Anther smuts of Caryophyllaceae: molecular characters indicate host-dependent species delimitation. *Mycological Progress*: vol. 4 (3) pp. 225–238
- Lutz, Piatek, Kemler, Chlebicki and Oberwinkler** (2008). Anther smuts of Caryophyllaceae: molecular analyses reveal further new species. *Mycol Res* vol. 112 (Pt 11) pp. 1280-96
- Leese, Mayer and Held** (2008). Isolation of microsatellites from unknown genomes using known genomes as enrichment templates. *Limnol. Oceanogr. Methods* vol. 6 pp. 412-426
- Le Gac, Hood, Fournier and Giraud** (2007). Phylogenetic evidence of host-specific cryptic species in the anther smut fungus. *Evolution* vol. 61 (1) pp. 15-26
- Mayer** (2010) Phobos – a tandem repeat search tool for complete genomes. <rub.de/spezzoo/cm>
- Meyerhans, Vartanian and Wain-Hobson** (1990). DNA recombination during PCR. *Nucleic Acids Res* vol. 18 (7) pp. 1687
- Mülhardt** (2009). *Der Experimentator: Molekularbiologie / Genomics*. Spektrum Akademischer Verlag, 6. Auflage pp. 316
- Maizel and Lenk** (1981). Enhanced graphic matrix analysis of nucleic acid and protein sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* vol. 78 (12) pp. 7665-9
- Nolte, Stemshorn and Tautz** (2005). Direct cloning of microsatellite loci from *Cottus gobio* through a simplified enrichment procedure. *Mol Ecol Notes* vol. 5 (3) pp. 628-636
- Oliveira, Pádua and Zucchi** (2006). Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology* vol. 29 (2) pp. 294-307
- Pearse and Crandall** (2004). Beyond F_{ST} : analysis of population genetic data for conservation. *Conservation Genetics* 5, pp. 585-602
- Pupko and Graur** (1999). Evolution of microsatellites in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: role of length and number of repeated units. *J Mol Evol* vol. 48 (3) pp. 313-6
- Römpler, Dear, Krause, Meyer, Rohland, Schöneberg, Spriggs, Stiller and Hofreiter** (2006). Multiplex amplification of ancient DNA. *Nat Protoc* vol. 1 (2) pp. 720-8
- Rozen and Skaletsky** (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* vol. 132 pp. 365-86
- R Development Core Team** (2010). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, <R-project.org>.
- Schlötterer** (2000). Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* vol. 109 (6) pp. 365-71
- Schlötterer** (2004). The evolution of molecular markers - just a matter of fashion?. *Nat Rev Genet* vol. 5 (1) pp. 63-9
- Selkoe and Toonen** (2006). Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecol Lett* vol. 9 (5) pp. 615-29
- Sia, Jinks-Robertson and Petes** (1997). Genetic control of microsatellite stability. *Mutat Res* vol. 383 (1) pp. 61-70
- Shen, Qu, Wang, Lu, Wu, Li, Hang, Wang, Zhao and Zhang** (2010) MPprimer: a program for reliable multiplex PCR primer design. *BMC Bioinformatics* vol. 11 pp. 143
- Staden, Beal and Bonfield** (2000). The Staden package, 1998. *Methods Mol Biol* vol. 132 pp. 115-30

- Shinde, Lai, Sun and Arnheim** (2003) Taq DNA polymerase slippage mutation rates measured by PCR and quasi-likelihood analysis:(CA/GT) n and (A/T) n microsatellites. *Nucleic Acids Res*
- Schäfer, Kemler, Bauer and Begerow** (Eingereicht). The illustrated life cycle of *Microbotryum* on the host plant *Silene latifolia* (in review)
- Strand, Prolla, Liskay and Petes** (1993) Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. *Nature* vol. 365 (6443) pp. 274-6
- Ványkó** (2004). Anther smuts of Caryophyllaceae. Taxonomy, nomenclature, problems in species delimitation. *MYCOLOGIA* vol. 1 pp. 189-191
- Werth** (1911). Zur Biologie des Antherenbrandes. *Arb. aus der Kaiserl. Biolog. Anstalt für Land- und Forstwirtschaft* vol. 8 (3) pp. 427 - 450
- Winterberg** (2009). Untersuchungen über die genetische Variabilität und Wirtsspezifität von *Microbotryum saponariae* auf seinen Wirtspflanzen. Bachelor Arbeit, Ruhr-uni Bochum (Geobotanik)
- Yockteng, Marthey, Chiapello, Gendrault, Hood, Rodolphe, Devier, Wincker, Dossat and Giraud** (2007). Expressed sequence tags of the anther smut fungus, *Microbotryum violaceum*, identify mating and pathogenicity genes. *BMC genomics* vol. 8 (1) pp. 272

Kartenmaterial (verändert) Abb. 23;

wikipedia.org/wiki/Datei:Karte_Bundesrepublik_Deutschland.svg (Creative Commons-Lizenz)

commons.wikimedia.org/wiki/File:Europa.svg (GNU Free Documentation License)

8. Anhang

8.1 Laborbedarf

8.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

BioPhotometer	Eppendorf
Centrifuge 5424	Eppendorf
Duranglas Weithalsflaschen	Shott
EL-531VH	Sharp
Elektrophorese Power Supply	Consort EV243
Eppendorf Tubes (1,5 und 2 ml)	Sarstedt
Falcon Tubes	Sarstedt
Geldokumentationssystem E-Box	Vilber Lourmat
Küvette LG100-UV-G 5869	IMPLEN
Magnetrührer / Heizrührer (RH Basic 2)	IKA
Mikrowelle R-939(IN)	Scharp
PCR 8er Strips	Brand
Parafilm M	Brand
Pipettensatz (10, 20, 100, 1000 und 5000 µl)	Abimed - Discovery Autoclavable
Pipettenspitzen	Sarstedt
Präzisionswaage 572	Kern
Thermocycler: DNA Engine	Bio-Rad
Thermomixer compact	Eppendorf
Vortex-Genie® 2	Scientific Industries, Inc.
Wärmeschrank UNB 500	Memmert

8.1.2 Chemikalien

10x Reaktionspuffer Y	Peqlab
Agarose	Bio Budget
Agarose	Roth
Bromphenolblau	Merck
EtOH (unvergällt)	J.T.Baker
Ethidiumbromid	Fischer
Saccharose	AppliChem
Taq Polymerase	Peqlab
Tris-Base	Sigma

8.1.3 Lösungen, Puffer und Medien

Agarose (0,8% / 2%)	Für 400 ml	
Agarose (Ultra-Qualität Roth)	3,2 g / 8 g	In der Mikrowelle, bis zum Auflösen der Agarose erhitzen. Achtung Siedeverzug! Bei 60°C im Wärmeschrank lagern.
1x TBE-Puffer	400 ml	
Ladepuffer (6x)	Für 100 ml	
50% (w/v) Saccharose	50 g	Mit TE-Puffer ansetzen, sterilfiltrieren, bei 4°C lagern.
0,1% (w/v) Bromphenolblau	0,125 g	
TBE-Puffer (5x)	Für 4000 ml	
440,0 mM Tris-Base pH 8	270 g	Mit VE-Wasser auffüllen, bei Raumtemperatur lagern.
440,0 mM Borsäure	137,5 g	
10 mM EDTA pH 8	20 ml	
TE-Puffer (pH 8)	Für 1000 ml	
10 mM Tris-Base	1,21 g	Mit bidest Wasser auffüllen, pH auf 8 einstellen, in 100 ml Weithalsflaschen aliquotieren, 5 min bei 121°C autoklavieren.
1 mM EDTA * 2 H ₂ O	0,37 g	
TE-Puffer (pH 8 10x)	Für 100 ml	
100 mM Tris-Base	1,21 g	Mit bidest Wasser auffüllen, pH auf 8 einstellen, 5 min bei 121°C autoklavieren.
10 mM EDTA * 2 H ₂ O	0,37 g	

8.1.4 Kits

my-Budget Double Pure Kit

Bio-Budget

8.1.5 Primer

Tab. 8: Von Sigma-Genosys hergestellte Primer. Darstellung von 5' nach 3'.

VEC1_fw	GGAAGTGCTCCGAGCGAAGGAA
VEC2_fp_m	ATCATCCCAGAATCACCCCTCAGTA
VEC2_rp_m	CTCCCAGTCCCCTTGGATACGAGT
VEC3_fp	CGGGCTTGGAGGTCAACTACTCAC
VEC3_fp_M13	CACGACGTTGTAACGACCGGGCTTGGAGGTCAACTACTCAC
VEC3_rp	TCGCGGGAGCACCGGTAAAAAC
VEC4_fp	TCGGCGGTTACTGTCAACGAGG
VEC4_rp	GGGTGCGGTCTGGCTCATTGT
VEC5_fp	TTCGGATGGACTCGACACCGCA
VEC5_rp	ACCAACACTAGCACGCCTCCCT

VEC5_rp_M13 CACGACGTTGTAAAACGACACCAACACTAGCACGCCTCCCT
 VES7_fp ACCTTTTATCGCTCCTGCTGTGGC
 VES7_rp AGTCATTCCCCTCGCTCCCCAT
 VES7_rp_M13 CACGACGTTGTAAAACGACAGTCATTCCCCTCGCTCCCCAT

8.1.6 Längenmarker

1 kb Leiter	Bio Budget
50 bp DNA-Ladder	Roth

8.1.7 Datenverarbeitungsprogramme / Datenbanken

Adobe CS 5 Master Collection 5.0	adobe.com
Geneious Pro 4.8.5	geneious.com
MPprimer 1.3	code.google.com/p/mpprimer
NCBI (nucleotide blast)	blast.ncbi.nlm.nih.gov
Oligo Calc	basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html
Papers 1.9.3	mekentosj.com/papers
Phobos 3.3.10	ruhr-uni-bochum.de/spezzoo/cm/cm_phobos.htm
R 2.11.0	r-project.org
SequinR 2.0-9	cran.r-project.org/web/packages/seqinr/index.html
Saga Generation 2	saga.licor.com
Saga Light	saga.licor.com
Sequencher 4.9 (Build 4755)	genecodes.com
Staden Package rel 1.6.0	staden.sourceforge.net
STAMP v11	ruhr-uni-bochum.de/spezzoo/cm
primer3	frodo.wi.mit.edu/primer3

8.2 Verwendete DNA-Isolationen

Die verwendeten Isolationen stammen aus einer Bachelorarbeit (WINTERBERG 2009) und von Angela Schäfer. Die Isolationen ‚KW‘ wurden mit dem DNeasy Mini Plant Kit (Qiagen GmbH, Hilden) aus Sporenmaterial gewonnen. Alle Isolationen ‚AS‘ wurden über eine angepasste Phenol / Chlorophorm-Extraktionen (HOFFMAN & WINSTON 1987) ‚Ustiprep‘ aus *Microbotryum*-Kulturen gewonnen.

Tab. 9: In dieser Arbeit genutzte DNA Isolationen

Isolation	Art	Wirtsart	Isolationsmethode
AS 533 Hayingen	<i>M. saponariae</i>	<i>Saponaria officinalis</i>	Ustiprep
AS 452 Berlin	<i>M. saponariae</i>	<i>Saponaria officinalis</i>	Ustiprep
AS 450 Ungarn	<i>M. saponariae</i>	<i>Saponaria officinalis</i>	Ustiprep
KW2 Wöllaner Nock I	<i>M. saponariae</i>	<i>Saponaria pumila</i>	Plant Kit
KW3 Hochalmspitze I	<i>M. saponariae</i>	<i>Saponaria pumila</i>	Plant Kit
KW5 Hochalmspitze II	<i>M. saponariae</i>	<i>Saponaria pumila</i>	Plant Kit
KW7 Wöllaner Nock II	<i>M. saponariae</i>	<i>Saponaria pumila</i>	Plant Kit
KW10 Wöllaner Nock IV	<i>M. saponariae</i>	<i>Saponaria pumila</i>	Plant Kit
KW11 Wöllaner Nock III	<i>M. saponariae</i>	<i>Saponaria pumila</i>	Plant Kit
KW13 Ammertal I	<i>M. saponariae</i>	<i>Saponaria officinalis</i>	Plant Kit
KW16 Rottenburg III	<i>M. saponariae</i>	<i>Saponaria officinalis</i>	Plant Kit
KW17 Donautal I	<i>M. saponariae</i>	<i>Saponaria officinalis</i>	Plant Kit
KW22 Marbach	<i>M. saponariae</i>	<i>Saponaria officinalis</i>	Plant Kit
KW35 Bad Imnau	<i>M. saponariae</i>	<i>Saponaria officinalis</i>	Plant Kit
KW38 Neckar Anki VIII	<i>M. saponariae</i>	<i>Saponaria officinalis</i>	Plant Kit
KW50 Srpenica I	<i>M. saponariae</i>	<i>Saponaria officinalis</i>	Plant Kit
KW51 Bot. Garten Tübingen	<i>M. saponariae</i>	<i>Saponaria officinalis</i>	Plant Kit
KW53 Neckar Anki I	<i>M. saponariae</i>	<i>Saponaria officinalis</i>	Plant Kit
KW61 Rheintal IV	<i>M. saponariae</i>	<i>Saponaria officinalis</i>	Plant Kit

8.3 Ergänzende Daten

Auf den nachfolgenden Seiten werden Ergänzende Daten und Informationen zu dem Material und Methoden sowie zu dem Ergebniss-Teil dieser Arbeit zusammengestellt.

Auf dem dieser Arbeit beiliegenden Datenträger werden folgende Daten zur Verfügung gestellt (Dateiformate in []):

- Diese Bachelorarbeit [.pdf]
- 94 Mikrosatelliten angereicherte Sequenzen [.ab1]
- Original Acrylamid-Gelbilder [.tiff]
- Alignments mit Sequencher 4.8 mit und ohne Vector [Sequencher Files]

Tab. 10: Aligment der Sequenzen (ohne Klonierungsvektor). Sequenzen mit brauchbaren MS sind mit einem grünen bzw. bei Qualitativ unbrauchbaren mit einem grauen Balken markiert.

Name	Size	Quality	Kind
▼ Contig[0001]	319 BPs		Contig of 6
<i>Microbotryum_msat1_FL_A01-M13-FP</i>	319 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_B05-M13-FP</i>	319 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_D03-M13-FP</i>	319 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_D04-M13-FP</i>	319 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_E05-M13-FP</i>	319 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_F06-M13-FP</i>	319 BPs		AutoSeq Frag...
▼ Contig[0002]	330 BPs		Contig of 3
<i>Microbotryum_msat1_FL_C02-M13-FP</i>	330 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_A02-M13-FP</i>	330 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_G08-M13-FP</i>	330 BPs		AutoSeq Frag...
▼ Contig[0003]	511 BPs		Contig of 14
<i>Microbotryum_msat1_FL_H01-M13-FP</i>	511 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_A06-M13-FP</i>	511 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_C03-M13-FP</i>	511 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_A04-M13-FP</i>	511 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_H09-M13-FP</i>	511 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_H08-M13-FP</i>	511 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_E10-M13-FP</i>	511 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_C10-M13-FP</i>	511 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_A07-M13-FP</i>	511 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_C05-M13-FP</i>	511 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_E06-M13-FP</i>	511 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_H04-M13-FP</i>	511 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_G11-M13-FP</i>	511 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_A10-M13-FP</i>	511 BPs		AutoSeq Frag...
▼ Contig[0004]	427 BPs		Contig of 8
<i>Microbotryum_msat1_FL_A09-M13-FP</i>	427 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_F10-M13-FP</i>	427 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_H10-M13-FP</i>	427 BPs		AutoSeq Frag...
MICRO~64	427 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_B06-M13-FP</i>	427 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_H11-M13-FP</i>	427 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_D11-M13-FP</i>	427 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_G12-M13-FP</i>	427 BPs		AutoSeq Frag...
▼ Contig[0005]	306 BPs		Contig of 4
<i>Microbotryum_msat1_FL_B02-M13-FP</i>	306 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_E02-M13-FP</i>	306 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_G01-M13-FP</i>	306 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_H05-M13-FP</i>	306 BPs		AutoSeq Frag...
▼ Contig[0006]	230 BPs		Contig of 3
<i>Microbotryum_msat1_FL_H02-M13-FP</i>	230 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_B08-M13-FP</i>	230 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_C12-M13-FP</i>	230 BPs		AutoSeq Frag...
▼ Contig[0007]	357 BPs		Contig of 4
<i>Microbotryum_msat1_FL_D01-M13-FP</i>	357 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_F02-M13-FP</i>	357 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_B12-M13-FP</i>	357 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_D07-M13-FP</i>	357 BPs		AutoSeq Frag...
▼ Contig[0009]	338 BPs		Contig of 2
<i>Microbotryum_msat1_FL_E01-M13-FP</i>	338 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_G04-M13-FP</i>	338 BPs		AutoSeq Frag...
▼ Contig[0012]	475 BPs		Contig of 11
<i>Microbotryum_msat1_FL_G03-M13-FP</i>	447 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_G05-M13-FP</i>	447 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_A08-M13-FP</i>	447 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_C01-M13-FP</i>	447 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_D05-M13-FP</i>	447 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_D06-M13-FP</i>	447 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_E07-M13-FP</i>	447 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_E11-M13-FP</i>	475 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_G07-M13-FP</i>	475 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_A03-M13-FP</i>	475 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_B09-M13-FP</i>	475 BPs		AutoSeq Frag...

Name	Size	Quality	Kind
▼ Contig[0016]	323 BPs		Contig of 3
<i>Microbotryum_msat1_FL_E09-M13-FP</i>	323 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_H06-M13-FP</i>	323 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_H12-M13-FP</i>	323 BPs		AutoSeq Frag...
▼ Contig[0017]	382 BPs		Contig of 4
<i>Microbotryum_msat1_FL_A05-M13-FP</i>	382 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_B03-M13-FP</i>	382 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_D02-M13-FP</i>	382 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_F08-M13-FP</i>	382 BPs		AutoSeq Frag...
▼ Contig[0023]	314 BPs		Contig of 2
<i>Microbotryum_msat1_FL_A11-M13-FP</i>	314 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_H03-M13-FP</i>	314 BPs		AutoSeq Frag...
▼ Contig[0025]	451 BPs		Contig of 3
<i>Microbotryum_msat1_FL_B10-M13-FP</i>	451 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_E03-M13-FP</i>	451 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_D12-M13-FP</i>	204 BPs		AutoSeq Frag...
▼ Contig[0028]	359 BPs		Contig of 2
<i>Microbotryum_msat1_FL_B01-M13-FP</i>	359 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_F12-M13-FP</i>	359 BPs		AutoSeq Frag...
▼ Contig[0029]	263 BPs		Contig of 2
<i>Microbotryum_msat1_FL_C09-M13-FP</i>	263 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_G02-M13-FP</i>	263 BPs		AutoSeq Frag...
▼ Contig[0034]	355 BPs		Contig of 3
<i>Microbotryum_msat1_FL_D10-M13-FP</i>	355 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_B11-M13-FP</i>	355 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_F05-M13-FP</i>	355 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_A12-M13-FP</i>	2399 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_B04-M13-FP</i>	1606 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_B07-M13-FP</i>	353 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_C04-M13-FP</i>	1778 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_C06-M13-FP</i>	290 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_C07-M13-FP</i>	2087 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_C08-M13-FP</i>	1925 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_C11-M13-FP</i>	290 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_D08-M13-FP</i>	1874 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_D09-M13-FP</i>	284 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_E04-M13-FP</i>	294 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_E08-M13-FP</i>	1918 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_E12-M13-FP</i>	224 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_F01-M13-FP</i>	2006 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_F03-M13-FP</i>	409 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_F07-M13-FP</i>	244 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_F09-M13-FP</i>	359 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_F11-M13-FP</i>	2070 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_G06-M13-FP</i>	1639 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_G09-M13-FP</i>	1607 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_G10-M13-FP</i>	290 BPs		AutoSeq Frag...
<i>Microbotryum_msat1_FL_H07-M13-FP</i>	1741 BPs		AutoSeq Frag...

Tab. 11: Sequenzen / Contigs aus Tab. 11 welche MS enthalten und Umbenannt wurden.

Sequenz / Contig	Arbeitsname
Contig [0012] - Consensus Inclusively (Nur Sequenzen E11, G07, A03, B09 verwendet)	C1
Contig [0009] - Consensus Inclusively	C2
Contig [0025] - Consensus Inclusively	C3
Contig [0034] - Consensus by Popularity	C4
Contig [0003] - Consensus by Popularity	C5
<i>Microbotryum_msat1_FL_C11-M13-FP.ab1</i>	S7
<i>Microbotryum_msat1_FL_F03-M13-FP.ab1</i>	S8
<i>Microbotryum_msat1_FL_D09-M13-FP.ab1</i>	S9

Tab. 12: Sequenzbereiche in denen MS liegen (Zielbereiche, Geneius Pro + MPprimer) und Größen Bereiche der Amplifizierten Fragmente (MPprimer)

Arbeitsname	Sequenzbereich in [bp]	Größenbereich in [bp]
C1	382 - 424	369 - 469
C2	181 - 242	38 - 238
C3	46 - 73	251 - 451
C4	185 - 233	55 - 255
C5	127 - 195	311 - 511
S7	32 - 71	90 - 290

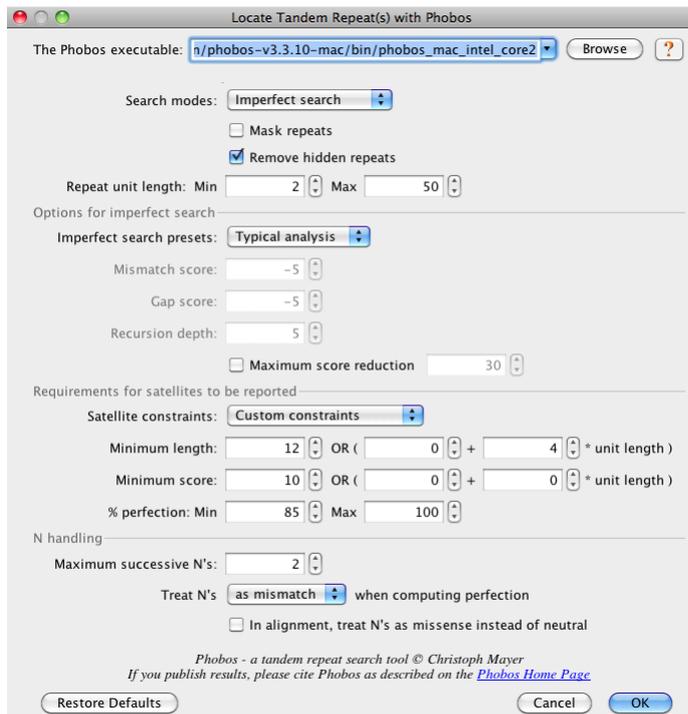


Abb. 25: Phobos Einstellungen für die MS Suche.

Tab. 13: Mit Primer3 über Geneius Pro entwickelte Primer. Primer die auf ein ,m^c enden wurden

Manuell verbessert. Oligocalc-Tests mit Standardeinstellungen der Website

■ = OK, ■ = Problem

Sequenz	Primersequenz		GC in %	T _m (Primer3) in°C	Oligocalc			
	Name	Sequenz von 5' → 3'			T _m Basic	Hairpin	Complementary	Self Annealing
C1	C1_fw	ATCGCGCCGACAATGCTTGC	60	59,31	56	■	■	■
C1	C1_rev	CGGGCTTGGAGGTCAACTACTCACT	56	59,95	61	■	■	■
C2	C2_fw	TCACCCCTCAGTATGGGCTGT	59	58,72	59	■	■	■
C2	C2_rev	CACCACCCTATTTCTCCAGTCCCC	60	60	63	■	■	■
C3	C3_fw	CGGGCTTGGAGGTCAACTACTCACT	56	59,95	61	■	■	■
C3	C3_rev	TCGCGGGAGCACCGGTAAAA	60	58,72	56	■	■	■
C4	C4_fw	AGCACGAACACCGGCAGAAGT	57	58,99	56	■	■	■

C4	C4_rev	AGGTGAAGTCGAAGGGTGCGGT	59	60,11	59			
C5	C5_fw	TTCGGATGGACTCGACACCGCA	59	60,24	59			
C5	C5_rev	ACCGCTCGCGACCAACACTA	60	58,46	56			
S7	S7_fw	ACCTTTTATCGCTCCTGCTGTGGC	54	59,53	59			
S7	S7_rev	ATCCCCATTTCCCCTACCCGCT	59	59,11	59			
S8	S8_fw	TGACCCTAAGCGGGAAGTCGCA	59	59,92	59			
S8	S8_rev_m	GACACTATTGTAATGATCCTGTGTGTGTGTGT	40	59,06	61			

Tab. 14: Mit Primer3 über MPprimer entwickelte Primer. Primer die auf ein m enden, wurden Manuell verbessert. Oligocalc-Tests mit Standardeinstellungen der Website ■ = OK, ■ = Problem.

Sequenz	Primersequenz		GC in %	T _m (Primer3) in °C	Oligocalc			
	Name	Sequenz von 5' → 3'			T _m Basic	Hairpin	Complementary	Self Annealing
C1	VEC1_fw	GGAAGTGCTCCGAGCGAAGGAA	59	58,91	59			
C1	VEC1_rp	CGGGCTTGGAGGTCAACTACTCAC	58	59,01	61			
C2	VEC2_fp	TCACCCCCTCAGTATGGGCTGT	59	58,72	59			
C2	VEC2_fp_m	ATCATCCCAGAATCACCCCCTCAGTA	50	58,31	60			
C2	VEC2_rp	ACCAACACTAGCACGCCTCCCT	59	57,18	59			
C2	VEC2_rp_m	CTCCCAGTCCCCTTGGATACGAGT	58	58,98	61			
C3	VEC3_fp	CGGGCTTGGAGGTCAACTACTCAC	58	59,01	61			
C3	VEC3_rp	TCGCGGGAGCACCGGTAAAAAC	59	59,99	59			
C4	VEC4_fp	TCGGCGGTTACTGTCAACGAGG	59	58,93	59			
C4	VEC4_rp	GGGTGCGGTCTGGCTCATTGT	59	59,67	59			
C5	VEC5_fp	TTCGGATGGACTCGACACCGCA	59	60,24	59			
C5	VEC5_rp	ACCAACACTAGCACGCCTCCCT	59	59,85	59			
S7	VES7_fp	ACCTTTTATCGCTCCTGCTGTGGC	54	59,53	59			
S7	VES7_rp	AGTCATTCCCCTCGCTCCCCAT	59	59,12	59			

Tab. 15: Mit der Sequenz M13 (CACGACGTTGTAAAACGAC) am 5' Ende verlängerte Primer. Oligocalc-Tests mit Standardeinstellungen der Website ■ = OK, ■ = Problem.

Sequenz	Primersequenz		Hairpin	Complementary	Self Annealing
	Name	Sequenz von 5' → 3'			
C3	VEC3_fw_M13	CACGACGTTGTAAAACGACCGGGCTTGGAGGTCAACTACTCAC			
C5	VEC5_rp_M13	CACGACGTTGTAAAACGACACCAACACTAGCACGCCTCCCT			
S7	VES7_rp_M13	CACGACGTTGTAAAACGACAGTCATTCCCCTCGCTCCCCAT			

9. Danksagung

Danken möchte ich:

- Herrn Prof. Dr. Dominik Begerow dafür, dass ich meine Bachelorarbeit in der Arbeitsgruppe Geobotanik schreiben konnte.
- Dr. Martin Kemler für das spannende Thema, die super Betreuung und die Möglichkeit eigene Ideen auszuprobieren.
- Herrn Prof. Dr. Ralph Tollrian, für die Übernahme des Zweitgutachtens.
- Dr. Florian Leese, Dr. Kathrin Lampert, Maximilian Schweinsberg, Thilo Gröning, sowie allen weiteren Mitarbeitern des Lehrstuhls für Evolutionsökologie und Biodiversität der Tiere, die mich bei dieser Arbeit inhaltlich und labortechnisch unterstützt haben.
- Allen Mitgliedern der AG Geobotanik, für die angenehme Atmosphäre und die Unterstützung bei dieser Arbeit. An dieser Stelle auch ein Danke an Angela Schäfer für die Betreuung im S-Block.

Des weiteren danken möchte ich;

- Meinen Eltern für ihre Unterstützung. Meiner Mutter außerdem für das gute Essen.
- Meinen Kommilitonen, die mich vom ersten Semester an unterstützt haben und bis heute begleiten. Insbesondere sei gedankt; Daniel Mann, Oliver Theisen und Sandro Zarbo.

10. Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die heute eingereichte Bachelorarbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie Zitate kenntlich gemacht habe. Bei der vorliegenden Bachelorarbeit handelt es sich um in Wort und Bild völlig übereinstimmende Exemplare.

Weiterhin erkläre ich, dass digitale Abbildungen nur die originalen Daten enthalten und in keinem Fall inhaltsverändernde Bildbearbeitung vorgenommen wurde.

Bochum, den 16.Juli 2010

Vasco Elbrecht