

Feinkartierung eines QTL (Quantitative Trait Locus) für Kühletoleranz auf Chromosom 4 in Mais und dessen molekularbiologische und phänotypische Charakterisierung.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Nino Baliashvili
aus Tbilisi, Georgien

Düsseldorf, Januar 2011

aus dem Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Pflanzen
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. P. Westhoff
Koreferent: Prof. Dr. P. Jahns

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Mais ist eine kühesensitive Pflanze	1
1.2.	Quantitative Vererbung	2
1.2.1.	„Quantitative Trait Loci“ (QTL)	2
1.2.2.	Herstellung doppelhaploider (DH) und nahe isogener Linien (NIL)	3
1.3.	Das Maisgenom	5
1.4.	Molekulare Marker	6
1.5.	QTL-Analyse der Kühletoleranz beim Mais	8
1.6.	Zielsetzung der Promotionsarbeit	12
2.	Material und Methoden	13
2.1.	Material	13
2.1.1.	Allgemeine Chemikalien	13
2.1.2.	Enzyme, Reaktions- und Exrtaktionskits	13
2.1.2.1.	Nukleinsäure-Polymerisierung und Modifizierung	13
2.1.2.2.	Kits zur Aufreinigung, Prozessierung und Modifizierung von DNA	13
2.1.2.3.	Molekulargewichtsstandards	14
2.1.3.	Medien und Reagenzien für die Bakterienzucht	14
2.1.4.	Biologisches Material	14
2.1.4.1.	Pflanzenmaterial	14
2.1.4.2.	Bakterienstämme	14
2.1.4.3.	Klonierungs- und Expressionsvektoren	14

2.1.5.	Oligonukleotide	15
2.1.6.	Geräte	18
2.2.	Methoden	18
2.2.1.	Anzucht und Phänotypisierung der Maispflanzen	18
2.2.2.	Mikroskopische Analyse von Blattquerschnitte	18
2.2.3.	Molekularbiologische Methoden	19
2.2.3.1.	Allgemeine molekularbiologische Techniken	19
2.2.3.2.	Isolierung der genomischen DNA aus Blättern	19
2.2.3.3.	RNA-Isolierung	20
2.2.3.4.	Synthese von cDNA	20
2.2.3.5.	Polymerasekettenreaktion (PCR)	21
2.2.3.6.	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäure	22
2.2.3.7.	Molekulare Marker	22
2.2.3.8.	Genetische Kartierung	23
2.2.4.	Anreicherung differentiell exprimierter Transkripte mittels suppressive Subtraktive Hybridization (SSH)	23
2.2.4.1.	<i>Rsa I</i> Restriktion und Adaptor-Ligation	25
2.2.4.2.	SSH-Hybridisierungen	26
2.2.4.3.	SSH-PCR-Reaktionen	26
2.2.4.4.	DNA-Vektor-Ligation	27
2.2.4.5.	Kolonie-PCR	27
2.2.5.	Macroarrayhybridisierung	28
2.2.5.1.	Der Transfer der PCR-Produkte auf eine Nylonmembran	28
2.2.5.2.	Radioaktive Markierung der Sonden	29
2.2.5.3.	Hybridisierung	29

2.2.6.	Sequenzierung und Sequenzanalyse	30
2.2.7.	Proteinanalyse	30
2.2.7.1.	Isolierung von Gesamtproteinen	30
2.2.7.2.	Bestimmung der Proteinkonzentration	30
2.2.7.3.	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	30
2.2.7.4.	Transfer von Proteinen aus dem Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran	31
2.2.7.5.	Immunodetektion der Proteine	31
2.2.7.6.	Coomasie-Blau Färbung der aufgetrennten Proteine	32
3.	Ergebnisse	33
3.1.	Phänotypische Charakterisierung der Maislinien SL und TH	33
3.2.	Blattchlorose und Frischmasseertrag sind unter Kühlebedingungen genetisch gekoppelt und weisen eine negative Korrelation auf	40
3.2.1.	Analyse der doppelhaploiden Linien (DHL)	40
3.2.2.	Analyse der nahe isogenen Linien (NIL)	42
3.3.	Die Entwicklung molekularer Marker für die QTL-Region auf dem Chromosom 4	45
3.3.1.	Die Markerentwicklung aufgrund vorhandener Genomsequenzen	45
3.3.2.	Die Markerentwicklung durch AFLP-Analyse	50

3.4.	Feinkartierung des Blattchlorose-Locus und des Frischmasse-QTL in sub-nahe-isogenen Linien (subNIL)	56
3.5.	Feinkartierung des Blattchlorose-Locus auf dem Chromosom 4 mittels aufspaltender F2-Populationen	60
3.6.	Vergleich der Proteinspiegel von sensitiven und toleranten Linien	65
3.7.	QTL4-vermittelte differenzielle Genexpression unter Kühlebedingungen	72
4.	Diskussion	78
4.1.	Analyse des Frischmasse-QTL auf dem Chromosom 4	78
4.2.	Analyse der Blattchlorose und Frischmasseertrag in den kühesensitiven und kühetoleranten Linien	81
4.3.	Analyse der differentiellen Genexpression	84
5.	Zusammenfassung	86
6.	Literatur	88
7.	Danksagung	95

Abkürzungen

ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
d	Tag(e)
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
DTE	Dithioerythrit
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
IPTG	Isopropyl- β -D-Galaktosid
kb	Kilobase(n)
kDa	Kilodalton
LB	english: Luria Broth
M	Stoffmenge in Mol
mg	Milligramm, 10^{-3} Gramm
Min.	Minute
mM	Millimolar, 10^{-3} Molar
μ g	Mikrogramm, 10^{-6} Gramm
μ M	Mikromolar, 10^{-6} Molar
mRNA	messenger RNA, Boten-RNA
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sek.	Sekunden
TEMED	Tetramethylethylenendiamin
Std.	Stunden
UpM	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
w/v	Gewicht pro Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
x-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid

1. Einleitung

1.1 Mais ist eine kühesensitive Pflanze

Mais stammt aus Mittelamerika und ist eine tropische, kühesensitive Nutzpflanze. Wachstum und Produktivität von Mais sind temperaturabhängig. Laut Miedema (1987) liegt die optimale Temperatur für den Wachstumsprozess der Maispflanze um 30⁰C, dies gilt auch für Keimung (Tollenaar *et al.*, 1979; Warrington und Kanemasu, 1983), sowie für die Frischmasseakkumulation nach der Keimung (Muldoon *et al.*, 1984). Bei Temperaturen niedriger als 20⁰C treten bereits die ersten Stresssymptome auf, die Pflanze wächst langsamer. Bei Temperaturen um 6-8⁰C wird das Wachstum gestoppt. Kältestress ist für die Maispflanze ein komplexes Phänomen mit physiologischen und biochemischen Änderungen sowohl auf Zellular- als auch auf Organebene. Wenn die Pflanzen dauerhaft der Kälte ausgesetzt sind, treten irreversible zelluläre Schäden auf. Die Maiskeimlinge weisen dann Nekrosen sowohl in Wurzel- als auch in Stängel- und Blatt-Gewebe auf (Miedema, 1982; Greaves, 1996). Kühle Temperaturen während der Wachstumsphase führen bei Mais zu einer verlangsamten Keimung, schlechter Jugendentwicklung und somit letztendlich zu einem Ertrags- und Qualitätsverlust (Leipner *et al.*, 2008).

Maisblätter sind extrem sensitiv gegenüber Kälte (Greaves, 1996). Miedema *et al.* (1987) zeigten, dass kältebehandelte Maiskeimlinge unterschiedliche Schäden aufwiesen: chlorotische Streifen auf Blättern, Nekrosen sowohl in jungen als auch in entwickelten Blättern und sogar der Tod der ganzen Pflanze. Zu beobachten war, dass junge Blätter sensitiver gegenüber der Kälte waren als entwickelte Blätter. Die Analyse der kältebehandelten Pflanzen zeigte, dass die Zellteilungszone der Blätter die Kältebehandlung überstanden hatte. Die Zellen oberhalb der Zellteilungszone waren besonders sensitiv gegenüber der Kälte. In dieser Zone entstanden später chlorotische Streifen (Miedema *et al.*, 1987; Long *et al.*, 1987). Die Bündelscheidenzellen der chlorotischen Streifen waren grün, während die Mesophyllzellen chlorotisch waren (Greaves 1996). Blattchlorose ist eines der meistbeobachteten Symptome, welches bei niedrigen Temperaturen bei Mais auftritt (Dolstra 1988). Sie ist das Ergebnis der Photooxidation des Chlorophylls in Blättern, die sich noch in der Entwicklungsphase befinden. Bei Temperaturen zwischen 10⁰C und 15⁰C wird neu synthetisiertes Chlorophyll sehr schnell abgebaut. Es wird zerstört, bevor es in die Thylakoide der Chloroplasten gelangt (McWilliam und Naylor 1967). Bei Temperaturen unter 10⁰C wird dieser Effekt durch den Abbau des membrangebundenen Chlorophylls verstärkt. Andererseits

haben Hodgins und van Huystee (1989) gezeigt, dass kälteinduzierte Chlorosen der Maiskeimlinge teilweise das Resultat einer gestörten Porphyrinbiosynthese sind. Der Chlorose-Effekt wird durch die Zunahme der Lichtintensität verstärkt (Miedema *et al.*, 1987; van Hasselt, 1990). Chlorosen können Indikatoren für eine gestörte Photosynthesekapazität sein. Die Chlorophyllmenge korreliert allerdings nicht immer mit der Photosyntheseeffizienz und der Frischmasseakkumulation (Greaves 1996).

Wachstum unter kühlen Bedingungen kann bei Maispflanzen Störungen in der Thylakoidentwicklung und im Proteinmetabolismus der Thylakoidmembran verursachen. (Fryer *et al.* 1998). Wächst die Pflanze unter kühlen Bedingungen, nimmt die Konzentration vieler Proteine ab. Außerdem werden bei niedriger Temperatur Elektrontransport und CO₂-Assimilation gestört. Es wurden unterschiedliche Effekte in der Entwicklung des Photosystems I und Photosystems II bei niedriger Temperatur beobachtet. Die Aktivitäten der beiden Systeme werden bei 14⁰C zwar reduziert, das Photosystem II ist aber anfälliger als das Photosystem I (Nie und Baker 1991).

Ist die Pflanze einer Temperatur unter 10⁰C ausgesetzt, wird die Assimilation des CO₂ inhibiert und der photosynthetische Elektrontransport wird gedrosselt. Das Verhältnis in der Quanteneffizienz zwischen Photosystem I und Photosystem II während der Kälte ändert sich allerdings nicht, genau wie das Verhältnis zwischen nicht-zyklischem Elektrontransport und CO₂-Fixierung in kältebehandelten und nicht kältebehandelten Maisblättern (Foyer *et al.* 2002).

1.2 Quantitative Vererbung

1.2.1. „Quantitative Trait Loci“ (QTL)

Erste Studien zur QTL-Analyse wurden in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts durchgeführt. Diese zeigten, dass Gene existieren, welche Einfluss auf die quantitativen Eigenschaften haben und dass diese Gene auf Chromosomen kartiert werden können. Dadurch ließ sich also der „quantitative trait locus“ (QTL) als genetischen Ort definieren, wo unterschiedliche Allele miteinander segregieren und signifikante Effekte der quantitativen Eigenschaften auslösen (Salvi und Tuberosa, 2005). QTL ist ein Genombereich, der kodierend oder nicht kodierend sein kann.

Ein quantitatives Merkmal zeigt keine genetische Spaltung nach dem Modell der Mendelschen Vererbung. Es ist ein quantitativ variierendes Merkmal, das polygenisch vererbt

wird und zeigt ein Kontinuum, während mendelnde Merkmale meist monogenisch vererbt werden und diskontinuierlich variieren.

Die QTL-Kartierung ermöglicht es, diejenigen genomischen Regionen zu detektieren, welche polygene Eigenschaften kontrollieren. QTLs sind über das gesamte Genom verteilt, und ihre Ausprägung unterliegt zudem nichtgenetischen Effekten, die allgemein als Umwelteinflüsse bezeichnet werden, d. h. die Vererbung quantitativer Merkmale ist durch die Effekte einzelner Gene im Zusammenspiel mit Umwelteffekten bedingt (Falconer 1984). Unterschiedliche QTLs sind in verschiedenen Kulturpflanzen kloniert worden, ein QTL für die Architektur der Maispflanze wurde durch Doebley *et al.* (1997) kloniert. Die Domestizierung der Maispflanzen war meist ausgerichtet auf die Entwicklung der apikalen Dominanz. Laut Doebley *et al.* kontrolliert das *tb1*-Gen (*teosinte branched 1*) die apikale Dominanz der Maispflanze. Die Klonierung der *tb1* war wichtig nicht nur für das Verständnis der Evolution des Mais, sondern auch für die gesamte Pflanzenevolution. *tb1* ist nicht nur in die Kontrolle der apikalen Meristeme involviert, sondern auch in die Entwicklung der Infloreszenz und Geschlechtsbestimmung. Ein QTL für den Blühzeitpunkt der Maispflanze wurde durch Salvi *et al.* (2002) studiert und wurde *Vgt1* (*Vegetative to generative transition 1*) genannt. Die Klonierung des Gens *Vgt1* lässt die molekularen Mechanismen des Überganges von der vegetativen zur reproduktiven Phase bei Kulturpflanzen unabhängig von der Photoperiode besser verstehen. Die Wirkweise der QTLs kann unterschiedlich sein. Ein QTL kann die Genexpression differentiell beeinflussen. Eine der Methoden zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene stellt die Suppression-Subtraktions-Hybridisierung (SSH) (Diatchenko *et al.* 1996) dar. Die SSH ist eine effiziente Methode, um zwei verschiedene mRNA-Populationen zu vergleichen und selten vorkommende Transkripte zu detektieren. Sie ermöglicht die Amplifizierung und Identifizierung differentiell exprimierter Gene.

1.2.2. Herstellung doppelhaploider (DH) und nahe isogener Linien (NIL)

Das Ziel der Linienzüchtung besteht in der Erzeugung hochgradig homozygoter Linien durch fortgesetzte Selbstung. Ein häufig angewendetes Verfahren in der Züchtung ist die Erzeugung von doppelhaploiden (DH) Pflanzen, deren Eigenschaften in den weiteren Generationen genetisch nicht mehr spalten. Durch den Einsatz von Colchicin (Inhaltsstoff der Herbstzeitlosen, *Colchicum autumnale*) oder anderer chemischer Substanzen, wie Trifluralin, Amiprofos-methyl oder Pronamid, die eine Zellteilung verhindern, wird eine Verdoppelung der Chromosomen herbeigeführt. Daher besitzen doppelhaploide Pflanzen einen hohen

Homozygotiegrad. Vorteile der DH-Linien in der Züchtung sind hohe genetische Varianz, komplette Homozygotie und die optimale Tauglichkeit für die Kartierung (Geiger und Gordillo, 2009). Das Verfahren der Herstellung der DH-Linien über maternale Haploide wurde davon ausgehend entwickelt, dass bestimmte Genotypen, auch als Inducerlinien bezeichnet, in der Lage sind, haploide Nachkommen entstehen zu lassen, wenn sie als Pollenspender eingesetzt werden (Coe 1959).

Die DH-Linien können durch *in vitro*-Kultivierung der haploiden Pflanzenteile oder durch *in vivo*-Haploideninduktion hergestellt werden. Bei der *in vitro*-Kultivierung werden die DH-Linien aus isolierten Mikrosporen oder ganzen Antheren hergestellt. Durch die Zugabe der Hormone entwickeln sich aus den Mikrosporen die haploiden Sprosse. Das Genom der haploiden Sprosse wird danach spontan oder durch Zugabe von Colchicin verdoppelt. Dadurch entstehen vollständig homozygote DH-Linien. *In vitro*-Verfahren zur Produktion von DH-Pflanzen über Antheren- oder Mikrosporenkultur konnten bei Mais bislang nicht erfolgreich eingesetzt werden (Büter, 1997). Fast alle kommerziellen DH-Linien-Züchtungsprogramme basieren auf der Methode der *in vivo*-Haploideninduktion (Seitz, 2005; Barret *et al.*, 2008; Rotarenko *et al.*, 2009). Die Anzahl erzeugter DH-Linien ist von der Induktionsrate der eingesetzten Linien anhängig. Der Einsatz einer Induktionslinie mit einer hohen Induktionsfrequenz ist wichtig für die Herstellung der DH-Linien.

Der Mechanismus der Haploideninduktion und der Entstehung haploider Embryonen ist ungeklärt. Es gibt zwei Hypothesen über die Mechanismen zu Entstehung der haploiden Linien:

1) Einer von zwei Samen der Induktorpflanzen ist in der Lage, mit der Eizelle der Donorlinie zu fusionieren. Während der Zellteilung werden die Chromosomen der Induktorpflanze eliminiert. Die zweite Samenzelle fusioniert mit der zentralen Zelle, und es entsteht ein reguläres triploides Endosperm.

2) Eine der zwei Samenzellen ist nicht in der Lage, mit der Eizelle zu fusionieren, kann aber der Auslöser der haploiden Embryogenese sein. Durch die Fusion der zweiten Samenzelle mit der zentralen Zelle entsteht ein reguläres triploides Endosperm (Geiger und Gordillo, 2009). Die haploiden Körner weisen normale Keimungsrate auf und werden zu überlebensfähigen haploiden Keimlingen (Röber *et al.*, 2005; Geiger 2009). Haploide Maispflanzen sind vital und können durch die künstliche Chromosomenverdoppelung und Selbstung der Keimlinge in doppelhaploide Linien (DH-Linien) überführt werden (Geiger und Gordillo, 2009).

Die meistgenutzte Strategie zur Verifizierung der QTL ist die Herstellung naher isogener Linien (NIL), die sich nur in einem Chromosom-Segment unterscheiden. In den NI-Linien

werden die Segmente des Donor-Elters durch weitere Rückkreuzungen mit dem rekurrenten Elter weiter zerlegt. Das Ziel bei der Herstellung der NI-Linien ist, solche Linien zu entwickeln, deren QTL-Region das Genom der Donor-Elter-Linie enthält, die aber ansonsten dem rekurrenten Elter-Genom entsprechen.

Für die QTL-Kartierung ist eine Population, die auf molekularen Markern basiert und eine phänotypische Eigenschaft, die mit den Variationen der Marker-Allelen kosegregiert, notwendig. Die genotypischen und phänotypischen Analysen der doppelhaploiden Linien (DHL) ermöglichen, eine QTL-Region zu detektieren und grob zu kartieren. Für die Feinkartierung und Einengung des QTLs ist die Herstellung der nahe isogenen Linien (NIL und subNIL) notwendig. Durch die BAC-Analyse und/oder die Analyse der genomischen Sequenzen wird die QTL-Region physikalisch kartiert. Die QTL-Lokalisierung auf einem BAC oder einer genomischen Sequenz ermöglicht die genetische Kartierung.

1.3 Das Maisgenom

Das Maisgenom umfasst 2,3 Gb und ist ca. 20mal größer als das von *Arabidopsis*, ca. 6mal größer als das Genom des Reises und ungefähr so groß wie das Genom des Menschen. Die Organisation des Maisgenoms ist komplexer als die von anderen bis heute sequenzierten Organismen. Das Maisgenom enthält ca. 32.000 Gene, die dann ca. 20% des Genoms ausmachen. Die Gene sind zwischen den hoch konservierten und häufig vorkommende Retrotransposons und anderen repetitiven Sequenzen organisiert. (San Miguel *et al.*, 1996). Fast 85% des Genoms besteht aus Transposons, die im ganzen Genom nicht gleichmäßig verteilt sind (Schnable *et al.*, 2009). Mais wurde vor ca. 10.000 Jahren aus Teosinte in Zentral-Amerika domestiziert (SanMiguel *et al.*, 1998). Die Duplikation des ganzen Maisgenoms hat vor ca. 5-12 Million Jahren stattgefunden (Blanc *et al.*, 2004; Swigonova *et al.*, 2004). Durch Proliferationen von Retrotransposons des LTR (long terminal repeat)-Typs hat sich die Größe des Maisgenoms in den letzten 3 Millionen Jahren dramatisch erhöht (2,3 Gb) (SanMiguel *et al.*, 1998). Um Gene über ihre Position im Genom klonieren zu können, werden genomische Bibliotheken auf die Basis von BACs (bacterial artificial chromosomes; Derivate von F'-Plasmiden) erstellt. Für Mais wurde eine BAC-Bibliothek (Cone *et al.*, 2002; Tomkins *et al.*, 2002) und eine integrierte genetisch/physikalische Karte mittels der Fingerprint-Methode (Cone *et al.*, 2002) erstellt. Sind lückenlos zusammenhängende BAC-Regionen („Contigs“) gebildet, ist es möglich, die Klone aus den Regionen zu sequenzieren

und zu analysieren (Stuber *et al.*, 1999). Für die Analyse von Organismen mit so komplexem Genom wie beim Mais, ist diese Methode sehr hilfreich. Die Datenbank www.maizesequence.org bietet die Informationen über die Sequenzen und die Anordnung der BAC-Contigs des Maisgenoms an, die auf die Maislinie B73 basieren. Im Jahre 2009 wurde das Maisgenom mittels BACs und Fosmiden sequenziert (Schnable *et al.* 2009). In einer neuen physikalischen Karte wurde die Anzahl der Contigs von 721 auf 435 reduziert. 405 Contigs, insgesamt 2,103.4Mb (99,2% des ganzen Genoms), wurden genetisch kartiert. Aufgrund der physikalischen, der genetischen und der Sequenz-Informationen wurde die B73 Reference Genom Sequence Version 1 (B73 RefGen_v1) entwickelt (Wie *et al.*, 2009).

1.4. Molekulare Marker

Das Ziel der Pflanzenzüchtung ist es, aus einer großen Zahl von Pflanzen diejenigen zu selektieren, die dem Zuchtziel entsprechen. Die klassische Züchtung basiert auf die Selektion des Genotyps über den Phänotyp. Die markergestützte Züchtung kombiniert direkt die Genomregionen über frankierende molekularen Marker miteinander, ohne zuvor zu phänotypisieren. Die Markergestützte Selektion ist inzwischen in die Züchtungsprogramme vieler wirtschaftlich wichtiger Nutzpflanzen integriert worden. Die Entwicklung molekularer Marker erlaubt es, genetische Kopplungskarten herzustellen und dadurch die QTLs zu kartieren.

Seit den 80-er Jahren werden DNA-basierte Methoden für die Erstellung genetischer Karten eingesetzt. Zu den Methoden zählen die *restriction fragment length polymorphisms* (RFLP; Botstein *et al.* 1980), *random amplified polymorphic DNAs* (RAPD; Williams *et al.* 1990), *simple sequence repeats* (SSR), *sequence-tagged sites* (STS), *inter-simple sequence repeats* (ISSR), *amplification fragment length polymorphisms* (AFLP; Vos *et al.* 1995), *cleaved amplified polymorphic sequences* (CAPS), *simple sequence repeats* (SSR) und andere.

Aus mehrfach wiederholten kurzen DNA-Sequenzen zusammengesetzte DNA-Abschnitte werden als Mikrosatelliten oder auch *simple sequence repeats* (SSR) bezeichnet. Mikrosatelliten bestehen meist aus Wiederholungseinheiten von bis zu fünf Nukleotiden. Diese Marker zeigen einen hohen Polymorphiegrad, außerdem sind sie multiallelisch und sind durch PCR leicht erfassbar (Rafalski *et al.* 1996).

CAPS, InDel (*Insertion/Deletion*) und SNP (*single nucleotide polymorphysm*) Marker gehören zu häufig genutzten Marker. Bei den CAPS-Markern werden PCR-Fragmente mit

Restriktionsenzymen zerlegt und die charakteristischen Produkte elektrophoretisch nachgewiesen. Längenunterschiede der Restriktionsprodukte zeigen Sequenzvarianten in PCR-amplifizierten DNA-Fragmenten an.

Eine oft benutzte Methode zur Entwicklung molekularer Marker ist die AFLP-Methode. Diese Methode ist als PCR-basierende Fingerprint-Technik zuerst von Zebau und Vos (1993) beschrieben worden und hat sich in der Genomforschung der Pflanzen schnell etabliert. Sie basiert auf der selektiven Amplifikation genomischer Fragmente mittels PCR. Zuerst wird die genomische DNA mit Restriktionsenzymen geschnitten (für den Restriktionsverdau werden zwei Restriktionsenzyme verwendet, wobei das eine Restriktionsenzym eher selten und das andere eher häufiger schneiden sollte). Anschließend werden die entstandenen Fragmentenden mit Adaptoren ligiert und mittels PCR amplifiziert (Vos *et al.*, 1995). Die AFLP-Polymorphismen werden dominant vererbt, und für die Anwendung dieser Methode sind keine Sequenzinformationen notwendig. Die AFLP-Technik wird für die Erstellung der Genomkarten genutzt.

1.5. QTL-Analyse der Kühletoleranz beim Mais

Kühletoleranz bedeutet eine schnelle Jugendentwicklung trotz kühler Witterung. Die Detektierung von QTL für Kühletoleranz des Photosystemapparates in Mais gelang Fracheboud *et al.* (2002,2004), Hund *et al.* (2005) und Jompuk *et al.* (2005). Für die Kreuzungen wurden zwei unterschiedlich kühletolerante Linien, die sich in der Chlorophyllfluoreszenz unterscheiden, genutzt. Dabei wurde festgestellt, dass der Hauptfaktor für die Toleranz des photosynthetischen Apparates während des Wachstums bei niedrigen Temperaturen die Photoinhibition (Fracheboud *et al.* 2004) ist.

Für die Untersuchung des QTL für Kühletoleranz in Mais wurden die kühesensitive SL- und die kühletolerante TH-Linie genutzt. Beide Linien (SL und TH) gehören den Dent-Mais-Pool (Zahnmais) an. Dent-Mais weist im Vergleich zu Flint-Mais (Hartmais) schlechtere Kühletoleranz (Dolstra *et al.*, 1988) auf. Das Ertragspotenzial des Dent-Mais ist allerdings höher, als das von dem Flint-Mais. Beide Linien repräsentieren aktuelles Elitezuchtmaterial der KWS SAAT AG, Einbeck. Sie unterscheiden sich hochsignifikant im Frischmasse-Ertrag, sowohl bei den Linien *per se* als auch in der Testkreuzungsleistung (Presterl *et al.*, 2007). Als wichtiges Zielmerkmal wurde die Pflanzenfrischmasse zu Beginn der Schossphase definiert. Dieses Stadium wird in Deutschland im Durchschnitt zwischen Mitte Juni und Mitte Juli erreicht. Abbildung 1-1 zeigt Wachstumsunterschiede zwischen SL- und TH-Linie im früheren Stadium und zum Zeitpunkt der Ernte.

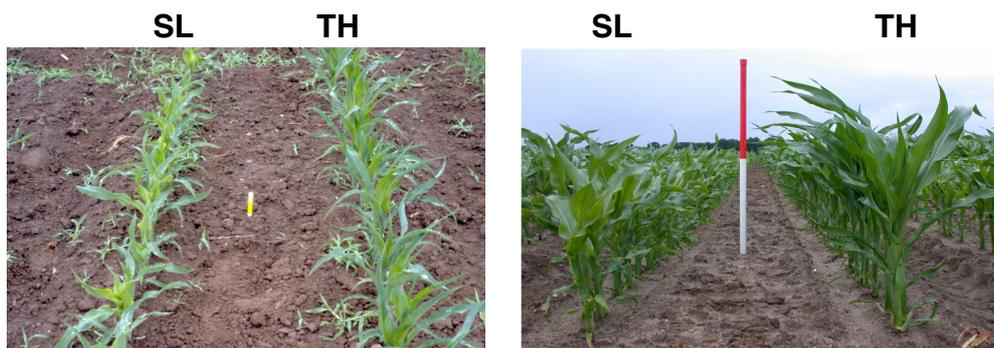


Abbildung 1-1: Wachstumsunterschiede zwischen sensiblen (SL) und toleranten (TH) Linien im frühen Stadium (links) und zum Zeitpunkt der Ernte (rechts).

Zur Untersuchung der QTL für Frischmasseertrag wurde eine Kartierungspopulation (720 Linien) aus aktuellem Zuchtmaterial verwendet und Leistungsprüfungen in elf Umwelten

(Ort/Jahr-Kombinationen) unterzogen. Im Jahr 2001 wurden die Linien an vier deutschen (Einbeck, Oberer Linidenhof, Walldorf und Eckartweiser bei Kehl) und an zwei französischen Orten (Arras und Tournois) angebaut. Im Jahre 2002 wurde der Anbau nur in Deutschland an den Orten Einbeck, Oberer Linidenhof, Walldorf, Hohenheim und Lönigen durchgeführt (Wilde *et al.*, 2005). Zur Verifizierung der QTL für Kühletoleranz wurden zum einen die Effekte der QTL in einer rekombinanten doppelhaploiden Linienpopulation (DHL) ermittelt, zum anderen wurden nahe isogene Linien (NIL) erstellt und auf ihre Kühletoleranz geprüft (Wilde *et al.* 2005). Doppelhaploide Linien wurden aus der Kreuzung zwischen kühesensitiven SL- und kühletoleranten TH-Linien erstellt. Die Pflanzen der F1-Population der Kreuzung SL X TH wurden mit der Induktorlinie bestäubt. Für die Verdoppelung des Chromosomensatzes wurden die haploiden Pflanzen mit Colchicin behandelt. Die doppelhaploiden (DH) Pflanzen werden selbstet um die doppelhaploiden Linien (DHL) zu erhalten (Presterl *et al.* 2007).

Die DH-Kartierungspopulation war mit 188 SSR-Markern genotypisiert worden. Die Markeranalyse zeigt, dass das positive QTL-Allel von dem kühletoleranten Elter stammt (Presterl *et al.*, 2007). Für Kühletoleranz konnten sieben QTL auf sechs Chromosomen detektiert werden (siehe Abbildung 1-2). Die QTL-Berechnung erfolgte mittels PLABQTL (Utz und Melchinger 1996).

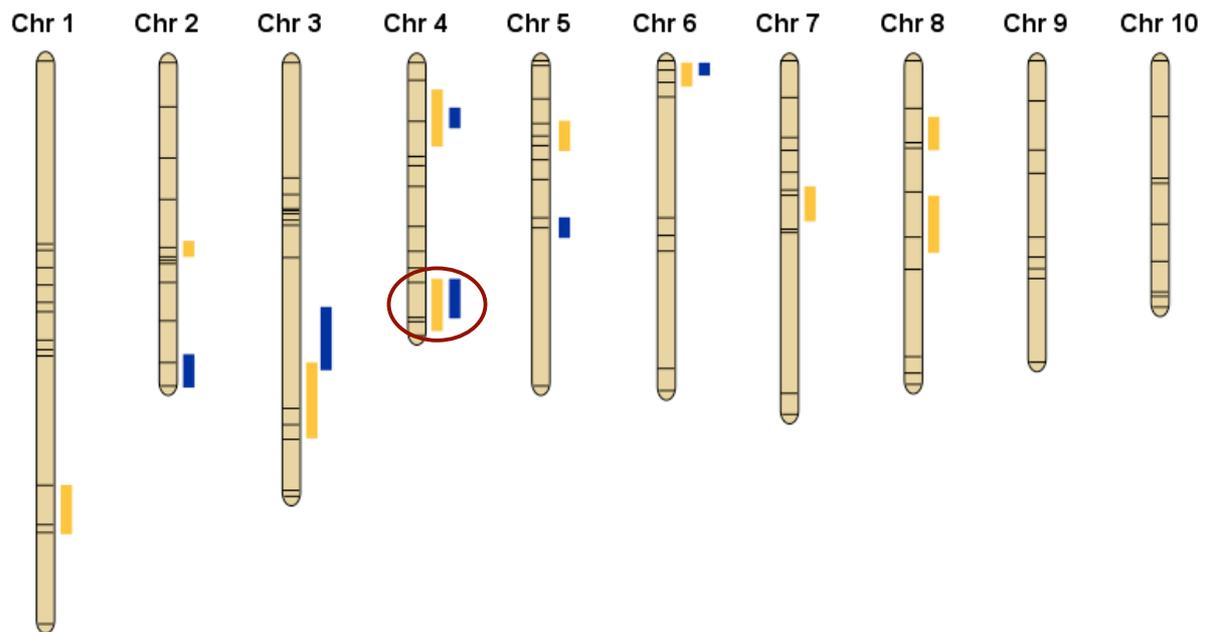


Abbildung 1-2: Schematische Darstellung der Verteilung der QTLs für Frischmasseertrag auf den Chromosomen. Blau und orange Balken stellen die Per-se-Leistung bzw. Testkreuzungsleistung der DH-Linien dar.

Der bedeutsamste Frischmasse-QTL wurde auf dem Chromosom 4 (QTL4) detektiert und erklärt 33,7% der phänotypischen Varianz. (Presterl *et al.*, 2007). Aus diesem Grund beschäftigt sich diese Arbeit im Weiteren mit dieser QTL-Region. Der QTL4 wurde zwischen den Markern Zm4-3 und Zm4-10 kartiert. (siehe Abbildung 1-3) Der Abstand zwischen den Markern beträgt nach genetischer Karte 26,3 cM. Nach der BAC-Analyse aus der Datenbank www.maizesequence.org sind die zwei Marker 155 Mb voneinander entfernt.

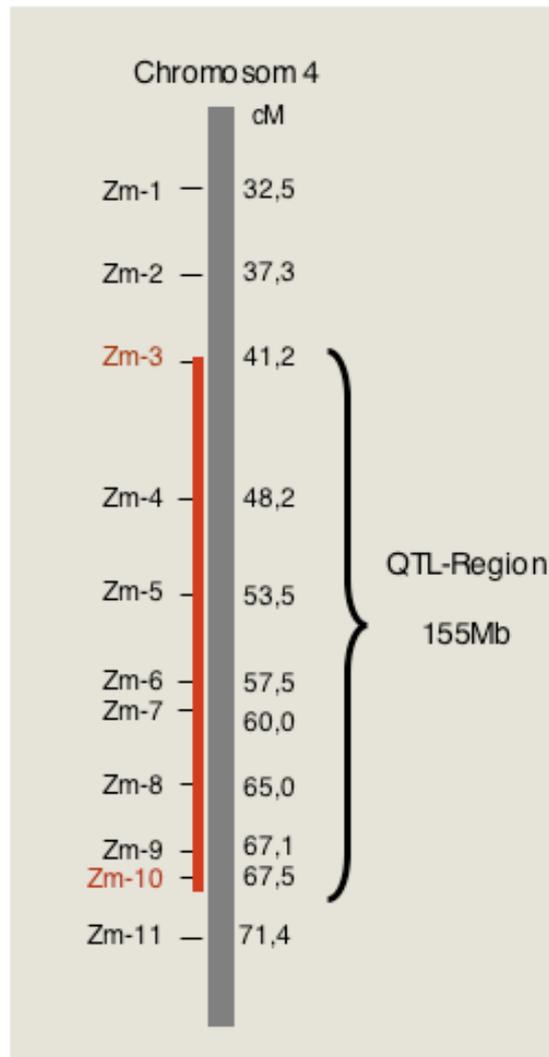


Abbildung 1-3: Schematische Darstellung des Frischmasse-QTL auf dem Chromosom 4.

Das Chromosom 4 ist grau dargestellt. Links vom Chromosom ist die Markerverteilung gezeigt, rechts sind die entsprechenden cM dargestellt. Der Frischmasse-QTL (rot dargestellt) auf dem Chromosom 4 beträgt nach physikalischer Karte 155Mb, während nach genetischer Karte diese Region 26,3cM umfasst.

1.6. Zielsetzung der Promotionsarbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, den QTL für den Frischmasseertrag auf dem Chromosom 4 zu analysieren und die genetische Grundlage für Kühletoleranz in Mais zu untersuchen. Die kühesensitiven (SL) und kühetoleranten (TH) Maislinien unterscheiden sich signifikant im Frischmasseertrag (Presterl *et al.* 2007). Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem Frischmasse-QTL auf dem Chromosom 4, der 33,7% der phänotypischen Varianz erklärt.

Die genotypischen Analysen der doppelhaploiden Linien (DHL) sowie der nahe isogenen Linien (NIL) ermöglichen, die QTL-Region auf dem Chromosom 4 zu untersuchen und einzuengen. Die geringe Markerdichte in der QTL4-Region machte es notwendig, neue molekulare Marker zu entwickeln.

Das Wachstum der Maispflanzen kann unter kühlen Bedingungen Störungen in der Thylakoidentwicklung und Proteinmetabolismus in der Thylakoidmembran verursachen. Aus diesem Grund sollte nach Unterschieden im Photosyntheseapparat der kühesensitiven und kühetoleranten Maislinien gesucht werden.

Ein weiteres Ziel der Arbeit war es, QTL-vermittelte differentielle Genexpression zu untersuchen. Durch Einsatz der Technik der suppressiven subtraktiven Hybridisierung (SSH) sollten Gene identifiziert werden, die für die Ausbildung der Kühletoleranz verantwortlich sind und auf die Kälte mit geänderter Expression reagieren.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Allgemeine Chemikalien

Alle verwendeten Pufferreagenzien und Salze waren von p.A.-Qualität und wurden von folgenden Firmen bezogen: AppliChem (Darmstadt), Amersham Bioscience (UK), Baker (Deventer, Niederlande), BD Biosciences Clontech (Palo Alto, USA), Biozym Scientific GmbH (Oldendorf), Fluka (Steinheim), Grünssing (Filsum), Janssen (Beerse, Belgien), Merck (Darmstadt), Riedel-de Haen (Seelze), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma (München), Sigma-Aldrich (Steinheim). Besondere Reagenzien und Materialien sind an entsprechenden Stellen aufgeführt.

2.1.2. Enzyme, Reaktions- und Extraktionskits

DNA modifizierende Enzyme mit den zugehörigen Puffern wurden von den Firmen MBI Fermentas (ST. Leon-Rot), Roche (Mannheim), Boehringer (Mannheim) bezogen. Folgende zusätzliche Enzyme und Reagenzien wurden genutzt:

2.1.2.1. Nukleinsäure-Polymerisierung und Modifizierung

Advantage cDNA Polymerase Mix	BD Biosciences Clontech (Palo Alto)
dNTP	MBI Fermentas (ST.Leon-Rot)
RNase A	Roche (Mannheim)
Radioaktivität (α - ³² P)-dATP	Amersham (UK)
Taq-DNA-Polymerase	eigene Aufreinigung
Superscript II Reverse-Transkriptase	Clontech (Palo Alto, USA)

2.1.2.2. Kits zur Aufreinigung, Prozessierung und Modifizierung von DNA

Oligotex mRNA Midi Kit	Qiagen (Hilden)
BD SMART TM cDNA Synthesis Kit	BD Biosciences Clontech (Palo Alto)
PCR-Select TM cDNA Subtraction Kit	Clontech (Palo Alto, USA)
Advantage cDNA Polymerase Mix	Clontech (Palo Alto, USA)
Megaprime DNA Labeling System	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)

QIAquick PCR Purification Kit	Qiegen (Hilden)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiegen (Hilden)
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen (Karlsruhe)
Sizesep 400spun Column Sepharose TM CL-4B	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo (Rockford, USA)

2.1.2.3. Molekulargewichtsstandards

DNA 1 kb – Leiter	Invitrogen (Karlsruhe)
RNA – Leiter	Invitrogen (Karlsruhe)
PageRuler Prestained Protein Ladder	MBI Fermentas (St.Leon-Rot)

2.1.3. Medien und Reagenzien für die Bakterienzucht

LB-Medium für die Anzucht von *E.coli*: 10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Hefe-Extrakt, 10 g/l NaCl, pH 7,2.

Agar-Agar	Serva (Heidelberg)
Isopropyl- β -D-Galaktosid (IPTG)	Roth (Karlsruhe)
5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid	Serva (Heidelberg)
Ampicillin	Serva (Heidelberg)

2.1.4. Biologisches Material

2.1.4.1. Pflanzenmaterial

Das Saatgut aller in dieser Arbeit analysierten Mais-Pflanzen wurde von der KWS (Einbeck) zur Verfügung gestellt.

2.1.4.2. Bakterienstämme

Der folgende Bakterienstamm wurde für die Vermehrung von Plasmid-DNA verwendet:

<i>Escherichia coli</i> – Stamm TOP 10	TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen)
--	----------------------------------

2.1.4.3. Klonierungs- und Expressionsvektoren

Folgendes Plasmid wurde als Klonierungs- und Expressionsvektor eingesetzt:

pCRII-TOPO	TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen)
------------	----------------------------------

2.1.5. Oligonukleotide

Oligonukleotide aus Kit

BD SMART II™ A Oligonukleotide:

5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG-3'
Rsa I

3' BD SMART™ CDS Primer II A:

5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT₍₃₀₎VN-3'(N=A,C, G, oder T; V=A, G, oder C)
Rsa I

5' PCR Primer II A:

5'-AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GT-3'

T7 Forward:

5' TTG TAA TAC GAC TCA CTA TAG 3'

M13 Reverse Primer

5' CAG GAA ACA GCT ATG AC 3'

Nested Primer 1

5' TCG AGC GGC CGC CCG GGC AGG TAC CTG CCC GG 3'

Nested Primer 2R

5' AGC GTG GTC GCG GCC GAG GTC GAC CTC G 3'

Adaptoren (SSH)

Adaptor 1:

5' CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGT 3'
3' GGCCCGTCCA 5'

Adaptor 2R:

5' CTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGTGGTCGCGGCCGAGGTCG 3'
3' GCTCCA 5'

Oligonukleotide für PCR-Reaktionen:

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) synthetisiert.

Bezeichnung	Anlagerungs- temperatur	Sequenz(F)	Sequenz(R)
164-G8F/R (HHU-Zm4-2)	56 °C	TTC CTG CTC ATA CAT CAA TC	CAG AGG ACA TCA GAT GTT G
164-4F/RII (HHU-Zm4-1)	54 °C	GAC AGT GAA ACA ACG CAG	CGT GAC TGT GAT TCG ATG
164-G110F/R	56 °C	AGC CAG CTC GTC TGC AC	TTA CTC CAA CCG ATG TCA C
164-G111F/R	56 °C	AAC ATT TCT GAA TTA CAG GTC	CAA GGG CTT TAT TTA ATT ATT C
164-103F/R	58 °C	GGA AGC AAG AGT ACG TCA G	CTG TCG GCG TTT CGA GAC
164-104F/R	56 °C	TTG ACA AGT CAC TTT AGT GC	ATG GCG ATC CAA GGT TTA G
164-G112F/RIII	56 °C	CCA CCA AAA AGC CAT AGA C	CTA TGG CAT TGA GGT GCT G
164-105F/R	56 °C	CGT TGT TGA CTC GAG TCC	AAA TGT TGA CGA TAA TAG CTC
164-108F/R	56 °C	TAA GAC ATA TAA GCA TTT CAA C	AAA CTC TAT GCT CGT ATC TG
165-T117FI/RII	56 °C	CCT AAA GCC ACC CAA GAG	GAA ATT TTG GAC CGA CCA C
166-G56F/R	56 °C	AAA TCG TCC ATC AAG TTT GG	AGG TAG TTC CAA ATT ACT TTG
166-G119F/RIII	56 °C	GTA TCA GCT TGA ATT CGT ATC	GCT CTT GTT GTC CAC CAC
166-G57IF/R	56 °C	CGT CAC TTG CTG CCA TTC	GCA TCA AGA TGT GGT CCA TG
166-G57VF/R	56 °C	CCA ATT CGA TAC TCT GGA TC	AAG CAG TTG GAC TTT TGA TG
166-G5F/R	56 °C	CAC AAA TTC ATC AAT GGT GC	GAA ACT GGT TAC ATG TGT TC
167-11FII/R (HHU-Zm4-4)	54 °C	CTA CCA GTT GGC TCT CG	TAG CTA GTG TAT GTT GTA TAG
167-G62F/R	56 °C	CGC AAA GTG ACC AAC ACA G	ACG AAA TGC CAG GTT CTA C
168-13FII/R	56 °C	CTC ATC AGA CGC ACA CTC	GCA TGA GAA CTC CCA GC
168-G13IIMF/R	56 °C	GAG CGT GAT GAG ACT GAG	GGT AGT GGT AAC AAC AGA TG
168-G64IIF/R	56 °C	CAA ATC TGG CAG ACC TGC	AAC CGC AAC GAG TTC GTC
168-G64FI/RI	56 °C	AGT AGG TGA CAA CGA TGT C	CAG GCT TGG TCT TAG CTC
168-G7F/R	56 °C	TGA TAA AGT AGC AGG AGT AG	AGA CTC ATG GAC TAT TCT AG
169-T126F/RI	56 °C	TGG TTT AGA CAT GGA CTG G	TCG CCA ACA GTT CAG TAA C
170-G28F/R	56 °C	TCC GTG CAG ATT CGC ATG	GTC TTC AGG GTG ATG ACC
170-G70IIIF/R	56 °C	TAA ATC AAT AGG TGC TGG AG	GAT CAG AAA GGC CAT CAT TG
170-G70IVF/R	56 °C	TCC AGA GGG AAA TGC ACC	GAC AAT TTT ACA TAT TTC TGC C
170-G70VF/R	56 °C	CAA CAT TTA ATA GAT TAT CCA AC	CAA TTT TAT CCA TCT CAG AAT G
171-G93F/R	56 °C	ACC ATA TTG CAC TAT GCA TC	TCT TCC GGA CAA GAT AGT TG
171-18F/R	56 °C	GCT TTG ATT CTC AAT CTA ATG	GGA TTG CAC CGT CTG AC
171-G130F/RI	56 °C	TCC GTA TAT GAA ACA AGT AG	ATC AAT TCA GGT GCT GCA G
171-G31F/R	56 °C	AGA TGA GAC TGA GGT GTG	GAC CAT CCA ATA CGG TGT C
171-131F/RII	58 °C	AGT TGA GCT TGT TCT TAG G	AGC AAA CTA GCT AGC TCT AG
171-21F/R	56 °C	GTC GTT GAT TGT TGA AAG TC	GTA ATT CTG CAA TCA TTT GAG
171-G9F/R	56 °C	TCA GAG ATG TCT GCA ATG C	TTC CAT ACA CCG TCA CAA C

Bezeichnung	Anlagerungs- temperatur	Sequenz(F)	Sequenz(R)
172-G96F/R	56 °C	TCG AGA TTG GCC ATG TAG	TTC TTC TAC CCT CAC CCT C
172-78F/R	56 °C	ACC AGC GAG GTT GCA ATC	AAC AAG GTT GAT GTT CAA ATC
177-G138FIIc/RIIc	56 °C	CGT CCT TCA TGT TTA CAA CAG	GCA TAA ACA CTT AAA CAG TTG
177-G138FIIb/RIIb	56 °C	GTT GAA GTC AGG CTT CTC	CTG TTG TAA ACA TGA AGG AC
177-138F/R	56 °C	ACA AAA CTG GTA TTT AGA CAA C	AGA CAG TAT TTC TGG ACT AC
179-45F/R	56 °C	CAC GAC ATC ACA TGA ACA G	AGT AAA TTG TCG CTG CGT G
179-T140FI/RIII	56 °C	TTG GTA CCT GAT ATG GGG AC	CAT CTT GTT ATG CAA AAC TAT G
181-G50F/R	56 °C	ACC AGC TCC TCG ACA GC	CGT CAT CGT CCA GTG AC
181-51F/R	56 °C	CGT TCG AGT GGG AAA CTG	GCT GCT CAT AGA CTT CAA GG
182-G1F/R (HHU-Zm4-3)	56 °C	GAG ATT CCT AGA GGC AGC	TGG GTA AAC AAC AGA GGA G
M54-209FI/RII	56 °C	ATT AGC TGT ATT GGT TCA TAC	TGC AGG AGC TAA TCT TCA G
M54-209FIV/RIV	54 °C	ATG GTG AGA GTA TCG AAA G	CTG GCA CAT AAC ACC TTT AG
M51-245FV/RIV	56 °C	TGC AAA GAC TAA TAG ACT ATC	GTA GTT ACC ACA TTG TAC AAC
M47-331FIV/RIV	56 °C	TGA TAA GAT AAT CAA GGA TGC	GAA GTC TTG GAC GTT GAC
M60-550FII/RII (HHU-Zm4-5)	56 °C	GCA GAA AGA CCC ATT TCC TTC TC	CAT GAA CTG AAC GTA TCA AC
M50-264P1/P2 (HHU-Zm4-6)	56 °C	TAACAGACATGAATTCAAGATG	AGAAAGCCAATTTGGAAAGTC
M51-429FI/RII	56 °C	CAC ATC TCA GCC AAT CCT C	GCC TTG GGT TGT TTC AGG
M51-429FIII/RV	56 °C	TAG GTC TAA AGT CTT TGA CTT G	GTC TGA ATT CTA CTG CAA TAC
M51-571FIII/RI	56 °C	TGC AGA CCA CAG TGC AAC	ATT CAA TTA TTT GCC TGC TTG
M51-571FIV/RVI	56 °C	TAG ACA CGT AGG TAT TAT TTC	AGA ATG TAA CAT CTC AAT TTA TG
M53-521FI/RII	56 °C	GAG GAG TCC TAC CAT CAC	ATG ACG GAA ATG CAC TGA C
M57-268FIII/RIII	58 °C	GCT GCC AAC GTT GCA AAT C	CTA TTA GCT GCA GGC TAT AG
M53-242FII/RII	56 °C	TGC AGA CCT GCA TTT TCT C	AGT AAC CGC TAA CAA CTT GG
M53-242FIV/RIII	58 °C	GAA CTC ATA GCT AAC TTG AAC	ATT TCT AGT GCA TAT CGA ATC
M49-197FIII/RIV	58 °C	TGC AAG TGA ATT AAA ATA CCT G	ATC GGC TCT TTA CAC CAT C
M60-155FVI/RVII	54 °C	TGC ATG GAC TAC GCG AC	AAC ATG AGA ACG ACG AAT C
M54-516FI/RII (HHU-Zm4-7)	58 °C	CAA CCA AGT TAT ATT TGC AGC	AGC ACC AAG AAA GCC TCA G
M50-245FV/RIII	58 °C	GTA GCC AAG CCT TTG AGA G	GCC ATT CAT GTC ACA ATT ATC
M51-238FIII/RIV	58 °C	ATT AAC AAT CTG ATT CTC TAG C	GTT TCT GCT GAT CTC ATT AAG
M54-515FVI/RVII	58 °C	CAT TCA GGA CAT TAT GGA TAC	AAC ATA GCC AAG AAA CGA TAC

2.1.6. Geräte

Acrylamid-Gelelektrophorese	Protean ^R II xi Cell (BioRad)
Phosphoimager	Fuji FLA3000-2R, 633nm laser
Photometer	Lambda 25 UV/VIS Spectrometer (PerkinElmer) PeqLab (NanoDrop) Spectrometer
Proteindetektion	LAS-4000 mini luminescent image analyser (FUJIFILM)
Über-Kopf-Schüttler	Heidolph REAX2
Thermocycler	Gene Amp PCR System 2700 (Applied Biosystems)
Szintillationszähler	Beckman LS5000CE
Videodokumentation	PeqLab biotechnologie GmbH
Zentrifugen	Tischzentrifuge 5415D (Eppendorf) Kühlzentrifuge „Thermo scientific“ (Sorval) Universal 30 RF (Eppendorf)

2.2. Methoden

2.2.1. Anzucht und Phänotypisierung der Maispflanzen

Maispflanzen wurden generell in der Klimakammer Conviron CMP4030 angezogen. Pflanzen wurden für zwei Wochen bei einer Temperatur von 25/22 °C (tags/nachts) bis zum Dreiblattstadium angezogen und anschließend eine Woche dem Kältestress 8/6 °C (tags/nachts) ausgesetzt. Nach der Kältebehandlung folgte die Erholung bei Temperatur 25/22 °C (tags/nachts). Die Lichtintensität betrug 400 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Als Lichtquelle dienten die Fluoreszenzlampen von Typ F72T12/CW/VHO 100W (OSRAM). Die Lichtperiode während der Anziehung betrug 14 h. Die phänotypische Analyse der Pflanzen erfolgte nach einer Woche Erholung vom Kältestress.

2.2.2. Mikroskopische Analyse von Blattquerschnitte

Für die mikroskopische Analyse von Blattquerschnitte wurden 4. und 5. Maisblätter manuell mit der Rasierklinge quergeschnitten. Die Querschnitte wurden in Entfärbelösung (Essigsäure 25 ml, Ethanol 75 ml) für 30 min. entfärbt und anschließend in 70 % Ethanol gelagert.

Die Pflanzenpräparate wurden mit Hilfe des Mikroskops Axiophot (Zeiss, Oberkochen) und der UV-Lampe HBO 50 W (Zeiss) unter Verwendung der integrierten Kamera Olympus DP50-CU (Olympus Optical Co., LTD., USA) analysiert.

2.2.3. Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1. Allgemeine molekularbiologische Techniken

Grundlegende molekularbiologische Verfahren wie die Klonierung, Restriktion und Ligation von DNA, Transformation von *E. coli*, photometrische DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung, die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegelen wurde nach Sambrook et al. (1989) durchgeführt. Die Elution von DNA-Fragmenten aus TBE-Agarosegelen sowie Aufreinigung von PCR-Fragmenten wurde nach Anleitung des Herstellers der Reagenziensätzen durchgeführt.

2.2.3.2. Isolierung der genomischen DNA aus Blättern

Extraktionspuffer:	0,35 M Sorbitol 0,1 M Tris 5 mM EDTA
Lysispuffer:	0,2 M Tris 0,05 M EDTA (pH 8) 2 M NaCl 4% CTAB
DNA-Isolierungspuffer:	40 ml Extraktionspuffer 40 ml Lysispuffer 5% Sarkosyl 20 mM Natriumdisulfit ad bis 100 ml mit Wasser

Junge Maisblätter wurden unter flüssigem Stickstoff zu Pulver zermahlen und portionsweise in frisch angesetzttem DNA-Isolierungspuffer aufgenommen. Das Homogenat wurde für 20

min. in ein 60⁰C-Wasserbad gestellt. Anschließend wurden die Proben (1:1 v/v) in Chloroform/Isoamylalkohol (24:1 v/v) aufgenommen und für 10 min bei 12000 Upm (Eppendorf Tisch-Zentrifuge) zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen und die DNA durch Zugabe von Isopropanol (1:1 v/v) gefällt. Dieses wurde 10 min. bei 12000 Upm erneut abzentrifugiert und in Wasser aufgenommen. Nach der Isolation der DNA wurde ein RNase-Verdau durchgeführt. Pro 100 µl DNA-Lösung wurde 1 µl RNase (1mg/ml) zugegeben und für 30 min. bei Raumtemperatur inkubiert.

2.2.3.3. RNA-Isolierung

2-5 g Pflanzenmaterial wurde in flüssigem Stickstoff pulverisiert und portionsweise in vorgelegten 5 ml Homogenisationsmedium (0,33 M Sorbitol, 0,2 M Tris-Hcl pH 9,0, 0,3 M NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM EGTA, 2% (w/v) SDS; 40⁰C) und 5 ml Phenol (pH 8, 40⁰C) eingemischt. Dann wurde 5 ml Chlorophorm zugefügt und die Emulsion ca. 10 min. auf einem Magnetrührer kräftig gemischt. Nach gründlicher Vermischung wurde die wässrige Phase durch Zentrifugation (5 min., bei 3500 Upm, HS4-Rotor, Raumtemperatur) abgetrennt und mit 5 ml Phenol und anschließend zweimal mit 5 ml Chloroform reextrahiert. Die Nukleinsäure wurden über Nacht bei -20⁰C in 1/20 Vol. 4 M Natriumacetat (pH 6,0) und 1 Vol. Isopropanol gefällt, dann abzentrifugiert (SS34-Rotor, 10 min., 10000Upm). Das Sediment wurde mit 3 ml 70% Ethanol zweimal gewaschen, abgetrocknet, zweimal in 0,5 ml TBE-Puffer (80 mM Tris/Borsäure, 10 mM EDTA; pH 8,0) bei 4⁰C gelöst und unlösliche Partikel sedimentiert. Die RNA wurde mit Lithiumchlorid (1/3 Vol. 8 M LiCl) versetzt und über Nacht auf Eis gefällt. Dann wurde die RNA zweimal mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in Wasser gelöst. Aus der RNA-Lösung wurde polyadenylierte „PolyA⁺⁺-mRNA nach Anleitung des Herstellers mit der „*Oligotex mRNA Midi Kit*“ (Qiagen, Hilden) isoliert.

2.2.3.4. Synthese von cDNA

Die cDNA-Synthese wurde nach „PolyA⁺⁺-mRNA nach BD SMARTTM cDNA Synthesis Kit Protokoll und mittels Superscript II Reverse-Transkriptase nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und kurz herunterzentrifugiert. Für die Amplifizierung der ds-cDNA sollten optimale Zyklen für die PCR-Reaktion bestimmt werden.

PCR-Reaktion:

Denaturierung	95 °C	1 min	
Denaturierung	95 °C	15 sec	
Anlagerung	65 °C	30 sec	15-23 X
DNA-Synthese	68 °C	6 min	

Es wurde eine PCR mit 15 bis 23 Zyklen durchgeführt. Nach jedem zweiten Zyklus wurde aus der Probe ein Aliquot abgenommen und anschließend auf einen 1,2 % (w/v) Agarose/EtBr-Gel für die Kontrolle aufgetragen. Die optimale Zyklus-Zahl je nach Probe lag zwischen 16 und 18 Zyklen. Nach der Optimierung der PCR-Zyklus-Zahl wurde die Amplifizierung der ds-cDNA durchgeführt. Um die kleinen cDNA-Fragmente herauszufiltern, wurde eine Säulenchromatographie (SizeSep 400spun Column Sepharose™ CL-4B, Amersham Pharmacia Biotech) durchgeführt. Die Sepharose-Säule lässt nur DNA-Fragmente, die länger als 400 bp sind, durch. Anschließend wurde die ds-cDNA eingeeengt und gereinigt (Chloroform/Isoamylalkohol (24:1); n-Butanol; QIAquick, PCR Purifikation Kit).

2.2.3.5. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR können DNA-Sequenzen selektiv amplifiziert werden. Die Anlagerungstemperatur der Primern orientiert sich an der Länge der Sequenz und deren GC-Gehalt. Bei dieser Temperatur hybridisieren die Primer komplementär zum gewünschten DNA-Abschnitt. Der Zyklus endet mit der Verlängerung (Extensionsphase) der Primer durch eine hitzestabile DNA-Polymerase bei 72°C, was in der Synthese zweier getrennter doppelsträngiger DNA-Moleküle des gewünschten Abschnitts resultiert. Für die Standardreaktionen wurde eine *Taq*-Polymerase verwendet. Die Zeit, welche die *Taq* DNA-Polymerase zur Synthese einer 1 kb langen Sequenz benötigt, wurde bei einem Temperaturoptimum von 72°C mit einer Minute veranschlagt. Die in dieser Arbeit durchgeführten PCR-Bedingungen wurden auf Primern und auf die Größe des gewünschten PCR-Produkts eingestellt (Primer - siehe Anhang.).

Standard-PCR-Reaktionsansatz:

DNA	100 ng
5'-Primer	2 μ M
3'-Primer	2 μ M
dNTP	0,2 mM
<i>Taq</i> -Polymerase	1 μ l (1:20)
10 x PCR-Puffer	0,1 Vol
	mit H ₂ O ad 25 bis 50 μ l

2.2.3.6. Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäure

Die Konzentrationen von Nukleinsäuren wurden mit Hilfe eines Nanodrop-Spectrophotometer (PeqLab) bestimmt. Dazu wurde die optische Dichte (OD) einer Nukleinsäurelösung bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm gegen Wasser gemessen.

2.2.3.7. Molekulare Marker

Für die Entwicklung der molekularen Marker wurden die spezifischen Primer-Paare entwickelt und die PCR durchgeführt. Die PCR-Fragmente wurden sequenziert und analysiert. Um festzustellen, ob die amplifizierten Fragmente den gewünschten Fragmenten entsprechen, wurde die Datenbankanalyse durchgeführt. Dadurch konnte die physikalische Lokalisierung der DNA-Sequenzen festgestellt werden. Für die Entwicklung von InDel Markern wurden die Größen der amplifizierten DNA-Fragmente verglichen. Für die Entwicklung der SSR-Marker wurden die Sequenzen aus der Datenbank nach Mikrosatelliten durchsucht. Anschließend wurden die spezifischen Primer-Paare angelegt, PCR durchgeführt und die Sequenzen analysiert. Für die Entwicklung von CAPS-Markern wurde in den sequenzierten Fragmenten nach den Schnittstellen gesucht. Danach wurden die Fragmente mit entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten und analysiert. Für die DNA-Restriktion wurden ca. 100ng DNA mit 1 U Restriktionsenzym mit dem entsprechenden Puffer bei angegebener Temperatur für 2 h inkubiert. Die Größen der durch Verdau entstandenen DNA-Fragmente wurde mittels einer Gelelektrophorese im 2,5 % (w/v) Agarose-Gel analysiert.

2.2.3.8. Genetische Kartierung

Für die genetische Kartierung wurden die Markerdaten aller Einzelpflanzen der Gesamtpopulation verrechnet. Für die genetische Kartierung wurde das Programm JoinMap verwendet. Dieses Programm wurde von Stam und Van Ooijen (1995) für die Berechnung der genetischen Karten entwickelt. Dieses Programm ermöglicht Ergebnisse aus verschiedenen Kartierungsexperimenten zu verwenden. Durch die Kartierung werden die Abstände zwischen den Markern berechnet. Die Rekombinationshäufigkeiten zwischen zwei Markern werden in Centimorgan (cM) umgerechnet. Zwei Marker sind 1 cM voneinander entfernt, wenn sie mit einer Wahrscheinlichkeit von 1 % durch genetische Rekombination voneinander getrennt werden.

2.2.4. Anreicherung differentiell exprimierter Transkripte mittels suppressive subtraktive Hybridisierung (SSH)

Subtraktive Hybridisierung ist eine effiziente Methode, um zwei verschiedene mRNA-Populationen miteinander zu vergleichen und diejenigen Gene zu detektieren, die in einer der beiden Populationen exprimiert werden (Diatchenko et al. 1996). Sie basiert auf einer subtraktiven Hybridisierung zweier cDNA-Populationen, wodurch die gemeinsamen Transkripte bzw. cDNA-Sequenzen entfernt werden. Zuerst werden beide mRNA-Populationen in cDNA umgewandelt. Als „Tester“-cDNA wird die cDNA bezeichnet, welche die differentiell exprimierten Transkripte beinhaltet. Als „Driver“ dient die cDNA, die vor allem jene Transkriptkopien enthält, die gemeinsam in beiden cDNA-Populationen vorkommen, d.h. der „Driver“ wird vom „Tester“ „subtrahiert“. Zunächst werden die beiden mRNA-Populationen von Tester und Driver unter Verwendung eines Oligo(dT)-cDNA-Syntheseprimers mit integrierter *RsaI* Restriktionsschnittstelle revers transkribiert. Nach der cDNA-Synthese aus polyA⁺-RNA werden Tester- und Driver-cDNA getrennt voneinander mit dem Restriktionsenzym *RsaI* geschnitten. Nur die Tester-cDNA wird in zwei Fraktionen aufgeteilt und jede mit einem anderen zweiteiligen Adapter ligiert, der wegen der darin vorhandenen Primersequenzen für die spätere PCR-Amplifikation benötigt wird. Die Driver-cDNA erhält keinen Adaptor. Im nächsten Schritt hybridisieren in zwei getrennten Reaktionen die beiden Populationen von Tester-cDNA Einzelsträngen mit in hohem Überschuss zugegebener einzelsträngiger Driver-cDNA, die keine Primer-Bindungsstellen besitzt. Während dieser Hybridisierung entstehen verschiedene Hybride und einzelsträngige

Sequenzen (siehe Abbildung 2-1, a, b, c, d). Häufig vorkommende Fragmente, wie einerseits gemeinsame Sequenzen in den Testern und Drivern und andererseits sehr häufig in Testern vorkommende differentielle Sequenzen, reassoziieren schneller als seltene Sequenzen. Nach dieser Hybridisierung sind differentielle cDNA-Sequenzen gegenüber nicht differentiellen, noch nicht rehybridisierten einzelsträngigen Fragmenten, stark angereichert (siehe Abbildung 2-1, d). In der zweiten Hybridisierung werden die beiden Ansätze ohne Denaturierung vereinigt. Die für die Tester-cDNA-Population spezifischen und damit im Gesamtansatz seltenen Transkripte finden auch nach der sich anschließenden Vereinigung der bisher getrennten Ansätze keinen Hybridisierungspartner in der Driver-cDNA, bilden aber mit ihrer (den jeweils anderen Adapter tragenden) Entsprechung ein doppelsträngiges cDNA-Molekül (siehe Abbildung 2-1, e) mit zwei verschiedenen Primer-Bindungsstellen an den Enden. Dieses kann in der nun folgenden PCR unter Einsatz der entsprechenden Primer exponentiell amplifiziert werden. Die Amplifikation von sehr häufigen tester-cDNA-spezifischen Doppelsträngen, die sich schon im ersten Hybridisierungsschritt vereinigt haben und an beiden Enden identische Adapter tragen, wird durch die in der PCR bevorzugte Ausbildung einer sog. „Pfannenstiel-Struktur“ („pan handle“) weitestgehend unterdrückt (siehe Abbildung 2-1, b). Bei der PCR werden nur diejenigen Moleküle amplifiziert, die mit zwei unterschiedlichen Adaptoren verbunden sind oder Hybride, die mit gleichen Adaptoren verbunden sind. Dabei werden die Moleküle mit zwei unterschiedlichen Adaptoren exponentiell amplifiziert, die Moleküle mit einem Adaptor linear (siehe Abbildung 2-1, e bzw. c). In einer weiteren PCR wird mit einem nach innen versetzten Primerpaar („nested PCR“) die Spezifität der Amplifizierung noch einmal erhöht. Dadurch wird der Hintergrund verringert und die differentiell exprimierten Abschnitte werden weiter angereichert.

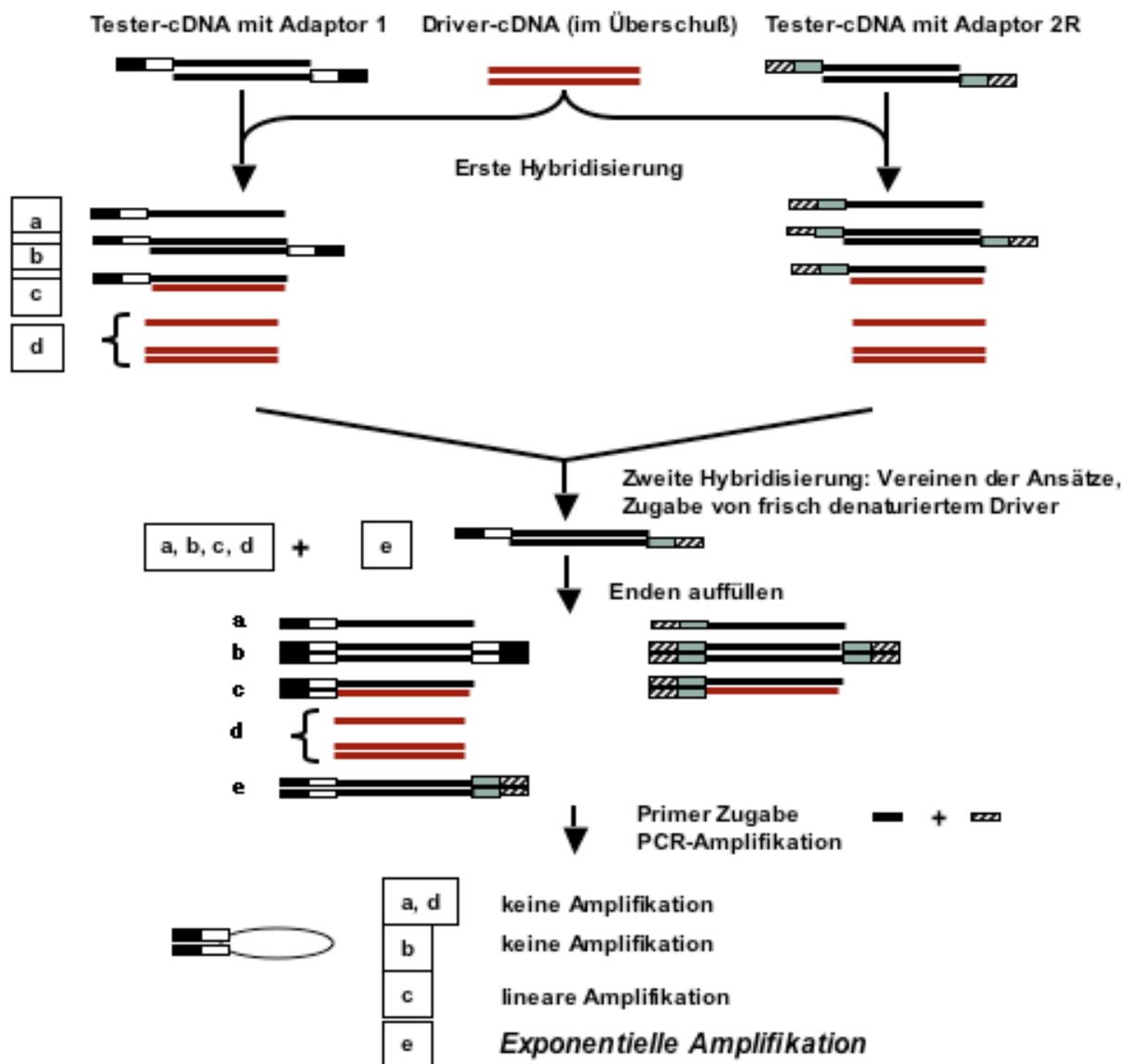


Abbildung 2-1: Schematische Darstellung der suppressive subtraktive Hybridisierung (SSH). Die Abbildung wurde in modifizierter Form aus der Veröffentlichung Diatchenko et al. (1996) entnommen. Weitere Erläuterungen befinden sich im Text.

Durchführung der SSH

2.2.4.1. *Rsa I* Restriktion und Adaptor-Ligation

Die Adaptor-Ligation wurde nach dem Handbuch der Herstellerfirma des „CLONTECH PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit, User Manual“ (CLONTECH) durchgeführt.

Die cDNAs (siehe 2.2.3.5.) wurden mit *Rsa I* geschnitten. Dadurch wurde die Länge der Nukleinsäure-Fragmente angeglichen und cDNA mit glatten Enden hergestellt. Die Restriktion erfolgte bei 37 °C für 3 Stunden. Danach wurde ein Aliquot von 10 µl entnommen

und in einem 1,2 % (w/v) TBE/EtBr Agarose-Gel analysiert. Der Restriktionsansatz wurde zwei aufgeteilt. Die erste Fraktion wurde direkt als Driver-cDNA verwendet. Mit der zweiten Fraktion (Tester-cDNA) wurde Adaptor-Ligation durchgeführt.

Die Tester-cDNA nach der *Rsa* I Verdau wurde in zwei Teile geteilt. Ein Aliquot wurde mit dem Adaptor 1 und das andere mit Adaptor 2R ligiert. Als Kontrolle wurde ein Aliquot von 2 µl mit beiden Adaptoren ligiert.

2.2.4.2. SSH-Hybridisierungen

Erste Hybridisierung

Bei der ersten Hybridisierung wurde die Driver-cDNA in einem 25-fachen Überschuß zu jeweils einem der beiden Tester-cDNA-Ligationsansätze zugegeben. Die Ansätze wurden mit einem Tropf Mineralöl beschichtet, bei 98 °C für 1,5 min. hitzedenaturiert und bei 68 °C für 8 h inkubiert.

Zweite Hybridisierung

Bei der zweiten Hybridisierung wurden beide Ansätze der ersten Hybridisierung zusammengegeben und nochmals frische denaturierte Driver-cDNA zugefügt. Der Ansatz wurde bei 68 °C über Nacht inkubiert. Anschließend wurde 200 µl Verdünnungspuffer dazugegeben und bei 68 °C für 7 min inkubiert. Die Proben wurden bei -20 °C aufbewahrt.

Durch zweite Hybridisierung werden nochmals differentiell exprimierte Sequenzen angereichert. Die Abbildung 2-1 zeigt bei dieser Hybridisierung entstandene Hybride.

2.2.4.3. SSH-PCR-Reaktionen

Für die PCR-Reaktion wurde der „Advantage cDNA Polymerase Mix“ benutzt.

Für die PCR-Reaktion sollte erst der optimale Zyklus bestimmt werden. Es wurden zwei Ansätze vorbereitet. Der erste Ansatz wurde nach 22 PCR-Zyklen gestoppt und auf Eis gelegt. Mit dem zweiten Ansatz wurde eine PCR-Reaktion von 22 bis 32 Zyklen durchgeführt. Nach jedem dritten Zyklus wurde ein Aliquot von 5 µl aus der Probe entnommen und auf einem 2% (w/v) TBE/EtBr-Gel aufgetrennt. Nach dem die optimale Zyklus-Zahl bestimmt war, wurden anschließend die restlichen Zyklen mit dem ersten Ansatz durchgeführt.

PCR-Reaktion 1

	75 °C	5 min	
Denaturierung	94 °C	25 s	
Denaturierung	94 °C	10 s	
Anlagerung	66 °C	30 s	22-32 X
DNA-Synthese	72 °C	1,5 min	

Zweite PCR-Reaktion wurde mit zwei internen Oligonukleotiden (Nested 1 und Nested 2R) durchgeführt. Bei dieser Reaktion werden differentiell exprimierte Sequenzen weiter angereichert und die unspezifischen reduziert.

Für die PCR-Reaktion sollte erst der optimale Zyklus bestimmt werden. Die PCR-Reaktionen wurden bei 8 bis 14 Zyklen durchgeführt.

PCR-Reaktion 2

Denaturierung	94 °C	10 s	
Anlagerung	68 °C	30 s	8-14 X
DNA-Synthese	72 °C	1,5 min	

2.2.4.4. DNA-Vektor-Ligation

Die Ligation eines PCR-Produkts in ein Plasmid wurde mit dem „TOPO TA Cloning Kit“ und nach Herstellervorschrift durchgeführt. Zur Ligation wurde die Methode des T/A-Klonierung angewendet.

2.2.4.5. Kolonie-PCR

Rekombinante Klone wurden mit sterilen Pipettenspitzen gepickt und auf eine LB-Agar-Ampicillin-Platte übertragen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Klone wurden einerseits direkt gepickt und in 96-Well-Mikrotiter-Platten mit PCR-Pre-Mix übertragen und andererseits für die Sequenzierung auf eine frische LB-Agar-Ampicillin-Platte übertragen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Standard PCR-Reaktion wurde unter Verwendung der Primer T7 und M13 durchgeführt.

PCR-Reaktionsansatz:

10 x PCR Reaktionspuffer	4 μ l
T7 (10 μ M)	0,4 μ l
M13 (10 μ M)	0,4 μ l
dNTP Mix (2,5 mM)	3,2 μ l
<i>Taq</i> -Polymerase (1U)	0,3 μ l
A.dest.	31,7 μ l
	Σ 40 μ l

PCR-Reaktion:

Denaturierung	94 $^{\circ}$ C	3 min	
Denaturierung	94 $^{\circ}$ C	20 s	
Anlagerung	58 $^{\circ}$ C	1 min	40 X
DNA-Synthese	72 $^{\circ}$ C	2 min	
	72 $^{\circ}$ C	5 min	

Nach der PCR-Reaktion wurde ein Aliquot von 4 μ l über 1,2 % (w/v) TBE/EtBr Agarose-Gel aufgetrennt.

2.2.5. Macroarrayhybridisierung

2.2.5.1. Der Transfer der PCR-Produkte auf eine Nylonmembran

Der Transfer der PCR-Produkte erfolgte mittels Multi-Blot-Replikator (Boekel) auf eine Nylonmembran (Hybond-N⁺, Amersham Bioscience). Der Multi-Blot-Replikator wurde im PCR-Produkt in einem 96-Well-Platte eingetaucht und 2 x 2 μ l auf die Nylonmembran übertragen. Nach dem Transfer wurden die Membrane 5 min auf - mit Denaturierunslösung getränktem - Filter-Papier denaturiert, anschließend 5 min. auf - mit Neutralisierungs-Lösung getränktem - Filter-Papier neutralisiert und danach in 2 x SSC geschwenkt. Die Fixierung der DNA auf der Membran erfolgte mittels Erhitzen der Membrane bei 80 $^{\circ}$ C für 2 St.

Denaturierungslösung:

NaOH 0,5 M

NaCl 1,5 M

Neutralisierungslösung:

Tris/Hcl (pH 7,4) 0,5 M

NaCl 1,5 M

20 x SSC:

NaCl 3 M

Tri-Natriumcitrat (pH7,0) 0,3 M

2.2.5.2. Radioaktive Markierung der Sonden

Zur radioaktiven Markierung wurde je 55 ng cDNA mit dem „Megaprime DNA Labelling System“ (Amersham) nach Angaben des Herstellers markiert.

Die Markierung erfolgte über Integration der gegen einen Teil der Desoxy-Adenin-Moleküle (dATP) ausgetauschten, radioaktiv markierten (α - ^{32}P)-dATP-Nukleotide. Pro Reaktion wurde 55 ng DNA und 15 μCi (α - ^{32}P)-dATP (Aktivität: 3000Ci/mmol) eingesetzt. Für die Einbaubestimmung der radioaktiv markierten (α - ^{32}P)-dATP-Nukleotide wurde ein Aliquot von 2 μl abgenommen und auf Whatman-Papier (Grade DE81, Size 2,3 cm) aufgetragen. Nicht eingebaute Nukleotide wurden durch Waschungen (x 3-4) in 0,5 M Na_2HPO_4 entfernt. Anschließend, wurde die Messung der Radioaktivität in den Szintillationszähler (Beckman, LS 5000CE) durchgeführt.

2.2.5.3. Hybridisierung

Die Membran wurde zunächst zur Absättigung freier Bindungsstellen im vorgewärmten Hybridisierungspuffer (250 mM Na_2HPO_4 , 7 % SDS, 2,5mM EDTA, pH 7,2) für 2 h bei 68 $^{\circ}\text{C}$ prähybridisiert. Danach wurde die Membran im vorgewärmten 5 ml Hybridisierungspuffer mit der Sonde über Nacht bei 68 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Um nicht gebundene Sondenmoleküle zu entfernen, wurde die Membran 4 x 20 min in und 1 x 15 min in 2 x SSC/0,1 % (w/v) SDS bei 68 $^{\circ}\text{C}$ gewaschen.

Die Detektion der Signale erfolgte durch Exposition auf einem Phosphoimager (Fuji FLA 3000-2R, 633 nm Laser), welcher radioaktive Signale von markierten Sonden produziert. Die

Exposition dauerte je nach Signalstärke 3-24 h. Die Analyse der Signale wurde durch das Software-Programm *Image Gauge* durchgeführt.

2.2.6. Sequenzierung und Sequenzanalyse

Die Sequenzierung erfolgte im Auftrag durch die Firma *Agowa*. Die Analyse der sequenzierten Fragmente wurden mit Hilfe der Datenbank BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) des NCBI (National Center for Biotechnology Information) durchgeführt. Die verschiedenen Sequenzen wurden unter Anwendung des Software-Programms *Lasergene* (Sequence Analysis Software) direkt verglichen.

2.2.7. Proteinanalyse

2.2.7.1. Isolierung von Gesamtproteinen

Für die Isolierung der Gesamtproteine wurden die Maisblätter in einem Mörser unter flüssigem Stickstoff zermahlen. Zur Konservierung der Proteine wurde dem Protein-Extraktionspuffer Proteaseinhibitor nach Angaben des Herstellers (Fa. Sigma) zugesetzt. Zellpulver wurde im Verhältnis 1:2 (v/w) unter Rühren in Protein-Extraktionspuffer (100mM Tris/HCl (pH 7,8), 4 M Harnstoff, 5 % SDS, 15 % Glycerin, 10 mM β -Merkaptoethanol) aufgenommen und für 4 min. aufgekocht. Das Homogenat wurde für 5 min. bei 12000 Upm und RT zentrifugiert. Der Überstand, der die Gesamtproteine enthielt, wurde abgenommen.

2.2.7.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde nach Bradford (Bradford, 1976) durchgeführt. Dafür wurden die Proteine 1:20 in Carbonatpuffer (100 mM Na_2CO_3 , 10 % (w/v) Saccharose, 50 mM Dithioerythrit (DTE)) verdünnt und 20 μl in 1 ml Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, München) pipettiert. Nach 10 min. wurde die Absorption bei 595 nm gemessen. Anhand einer BSA-Eichreihe (0,1-0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) konnte die Proteinkonzentration ermittelt werden.

2.2.7.3. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte unter denaturierenden Bedingungen durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach der

Methode von Schägger (Schägger und von Jagow, 1987). Als Stammlösung wurde 40 % Polyacrylamid mit einem Verhältnis von Acrylamid zu N,N'-Methylenbisacrylamid von 32 : 1 (AppliChem, Darmstadt) genutzt. Es wurden 12,5 % Trenngele (12,5 % Polyacrylamid, 1M Tris/HCl (pH 8,45), 0,1 % (w/v) SDS, 6 M Harnstoff) für die Auftrennung der Proteine mit größerer Masse und 18 % Trenngele (18 % Polyacrylamid) für die Auftrennung der kleineren Proteine benutzt. Die Sammelgele bestanden aus 4 % Polyacrylamid, 0,744 M Tris/HCl (pH 8,45) und 0,744 % (w/v) SDS.

Die Proteinproben wurden in 1 Volumen Probenpuffer (100 mM Na₂CO₃, 10 % (w/v) Saccharose, 50 mM Dithioerythrit (DTE), 5 % SDS, 0,02 % (w/v) Bromphenolblau) aufgenommen und direkt auf das Gel aufgetragen. Als Längenstandard wurde 10 µl von „PageRuler Prestained Protein Ladder“ (Fermentas) aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte über Nacht bei einer Spannung von 85 V. Der Kathodenpuffer enthielt 100 mM Tris / HCl, 100 mM Tricin, 0,1 % (w/v) SDS, pH 8,25. Anodenpuffer bestand aus 200 mM Tris / HCl, pH 8,9.

2.2.7.4. Transfer von Proteinen aus dem Polyacrylamidgel auf Nitrocellulosemembranen

Der Proteintransfer (Transferpuffer: 96 mM Glycin, 10 % (v/v) Methanol, 10 mM Tris) aus dem Polyacrylamidgel auf Nitrocellulosemembran (Schleicher und Schuell, Porengröße: 0,45 µm,) wurde mit einer Trockenblot-Apparatur (CTI) durchgeführt. Der Transfer der Proteine aus einem 12,5 %igem Gel wurde für 2 Stunden durchgeführt, aus 18 %igem Gel wurden die Proteine über 3 Stunden transferiert. Die Stromstärke wurde konstant bei 0,35 mA / cm² gehalten. Der erfolgreiche Proteintransfer wurde anschließend durch Färbung der Membrane mit Ponceau-Rot (Ponceau-Rot 2 % (w/v); Trichloressigsäure 3 % (w/v)) überprüft. Anschließend erfolgte die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit einem 5 %igen (w/v) Magermilchpulver in TBS-T-Puffer (Tris/HCl pH 7,6 20 mM; NaCl 137 mM; Tween-20 0,1 %) für eine Stunde.

2.2.7.5. Immunodetektion der Proteine

Die transferierten Proteine wurden durch Antikörper immunologisch detektiert. Die Erstantikörper stammten aus Kaninchen. Die Antikörper wurden in TBS-T-Puffer von 1:250 bis 1:3000 verdünnt (Siehe Tabelle 2-1) und mit Membranen für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf einem Über-Kopf-Schüttler inkubiert. Nach der Inkubierung wurden die Membrane 1 x 15 min. und 2 x 5 min. in TBS-T-Puffer gewaschen und anschließend mit einer

1:50000-Verdünnung des Anti-Rabbit-Peroxidase-Konjugats (Sigma,) für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.. Anschließend folgte die Waschung der Membrane 1 x 15 min. und 2 x 5 min in TBS-T-Puffer. Die Detektierung erfolgte durch LAS-4000 mini (FUJI, Luminescent image analyzer).

Antigen	Gruppe	Verdünnung	Spezies
AtpA	ATP-Synthase	1:2000	Spinat
Cytf	Cytochrom <i>b₆f</i>	1:2000	Spinat
PEP-Carboxylase	C4	1:5000	Flaveria trinervia
RbcL	große Untereinheit der Rubisko	1:2000	Chlorogonium
RbcS	kleine Untereinheit der Rubisko	1:250	
PsaA/B	PS I	1:2000	
PsaD	PS I	1:2000	Spinat
LHC I	PS I	1:1000	
LHC II	PS II	1:1000	Gerste
PsbA	PS II	1.2000	Synechocystis
PsbB	PS II	1:5000	Spinat
PsbC	PS II	1:3000	Gerste
PsbD	PS II	1:3000	
PsbO	PS II	1:1000	Mais
PsbR	PS II	1:500	Spinat
PsbE	PS II	1:3000	Spinat
CP29*	PS II	1:2000	Mais
*- zur Verfügung gestellt vom Prof. Bassi, Universität Verona			

Tabelle 2-1: genutzte Antikörper

2.2.7.6. Coomassie-Blau Färbung der aufgetrennten Proteine

Zur Analyse wurden die aufgetrennten Proteine mit Coomassie-Brillant-Blau (Methanol 35 % (v/v); Essigsäure 10 % (v/v); Coomassie-Brillant-Blue 0,2 % (v/v)) angefärbt

3. Ergebnisse

3.1 Phänotypische Charakterisierung der Maislinien SL und TH

Für die hier beschriebene Arbeit standen zwei europäische Maislinien, die kühesensitive SL und kühetolerante TH, zur Verfügung. Am Anfang der Arbeit wurde nach phänotypischen Eigenschaften gesucht, wonach sich die sensitiven und toleranten Linien unter Laborbedingungen in einem möglichst frühen Stadium unterscheiden. Es wurde nach Stresssymptomen in unterschiedlichen Bedingungen, wie unterschiedliche Kühletemperatur, der Gasaustausch, max. Quantumeffizienz der PSII, F_v/F_m , gesucht. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Linien festgestellt werden (Karin Ernst, mündliche Mitteilung, unveröffentlicht). Ein Unterschied, zwischen den SL- und TH-Linien konnte nur nach der Kältebehandlung bei einer Temperatur von $8^{\circ}\text{C}/6^{\circ}\text{C}$ (tags/nachts) detektiert werden. Die Pflanzen wurden dafür in der Klimakammer zwei Wochen bei $25^{\circ}\text{C}/22^{\circ}\text{C}$ (tags/nachts) bis zum Dreiblatt-Stadium angezogen und anschließend eine Woche dem Kältestress ($8^{\circ}\text{C}/6^{\circ}\text{C}$ tags/nachts) ausgesetzt. Die Unterschiede zwischen der SL- und TH-Linie traten erst im Anschluss an den Kältestress in der Erholungsphase bei warmen Temperaturen auf (siehe Abbildung 3-1).

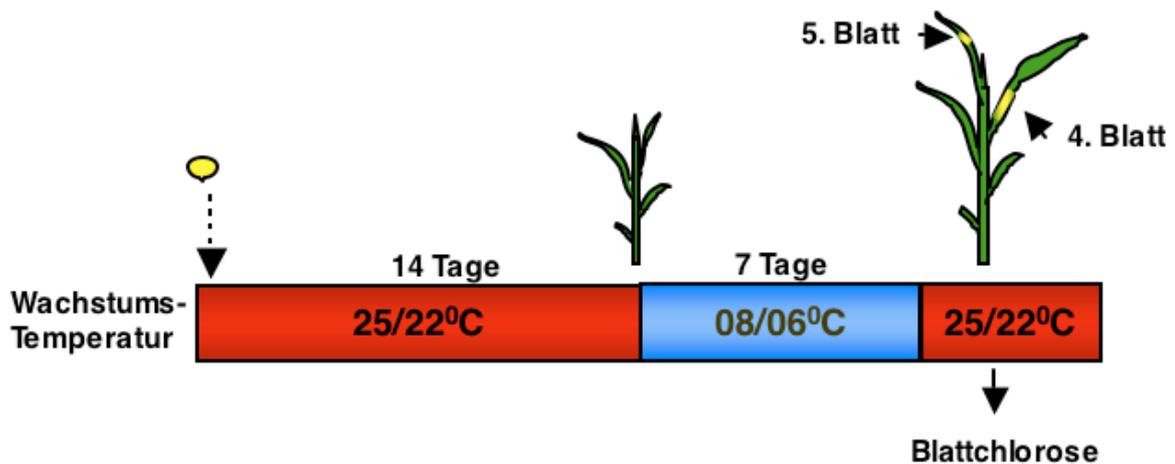


Abbildung 3-1: Anzuchtbedingungen der Maispflanzen unter Laborbedingungen.

Die 4. und 5. Blätter der kühesensitiven Linie (SL) zeigten einen chlorotischen Phänotyp. Diese Blätter waren während des Kältestresses noch nicht komplett entwickelt. Die Blattchlorose in der SL-Linie wurde schon nach dem vierten Tag der Erholung sichtbar. Allerdings war dieser Phänotyp im 4. und 5. Blatt in unterschiedlichen Blattzonen zu beobachten (siehe Abbildung 3-2).

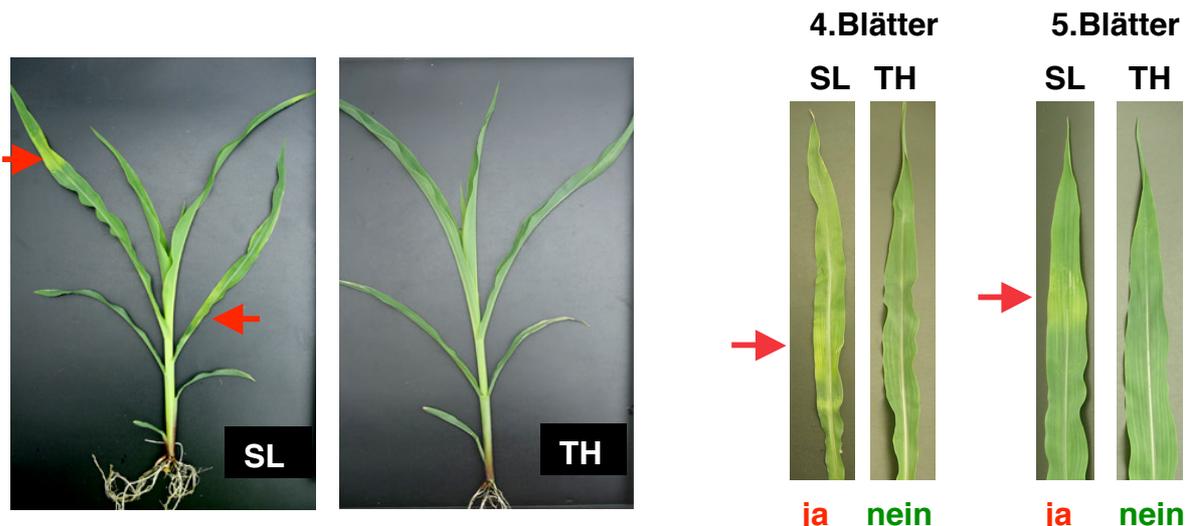


Abbildung 3-2: SL und TH Linien nach der Kältebehandlung.

Die TH (tolerante) und SL (sensitive) Linien wurden zwei Wochen bei 25⁰C/22⁰C (tags/nachts) angezogen und anschließend eine Woche der Kälte ausgesetzt (8⁰C/6⁰C, tags/nachts). Nach einer Woche Kälte wurde das Wachstum der Pflanzen weiter bei 25⁰C/22⁰C (tags/nachts) fortgesetzt. Die Lichtintensität während der Anziehung der Pflanzen in der Kammer betrug 400 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Links: die vierten und fünften Blätter der SL-Linie zeigen nach vier Tagen Erholung Blattchlorose-Phänotyp (in der Abbildung mit dem roten Pfeil gekennzeichnet). Rechts: Vergleich der vierten und fünften Blätter der SL- und TH-Linien nach vier Tagen Erholung.

Um die Blattchlorosen zu lokalisieren und um herauszufinden, in welcher Entwicklungsphase die Blätter den Schaden erlitten, der zur Blattchlorose führte, wurden folgende Experimente durchgeführt.

Zum einen wurden die basalen Zonen der Keimlinge (von der Erdoberfläche aufwärts) vor der Kältebehandlung in definierten Abständen mit Kanülen durchstoßen (siehe Abbildung 3-3, links). Dadurch wurden die Blätter durchlöchert und die unterschiedlichen Blattzonen markiert. Im Anschluss an die Erholungsphase wurden die Abstände zwischen den einzelnen Löchern gemäß Maßstab des Wachstums analysiert (siehe Abbildung 3-3, mitte, rechts). Die Analyse der Blätter zeigte, dass der Abstand zwischen den Löchern unterhalb der chlorotischen Region deutlich größer war als der Abstand zwischen den Löchern unmittelbar

in der Blattchlorose-Region oder knapp unterhalb. Daraus lässt sich schließen, dass die kälteempfindliche Region, die nach dem Kältestress den chlorotischen Phänotyp aufweist, oberhalb der Streckungszone lokalisiert ist.

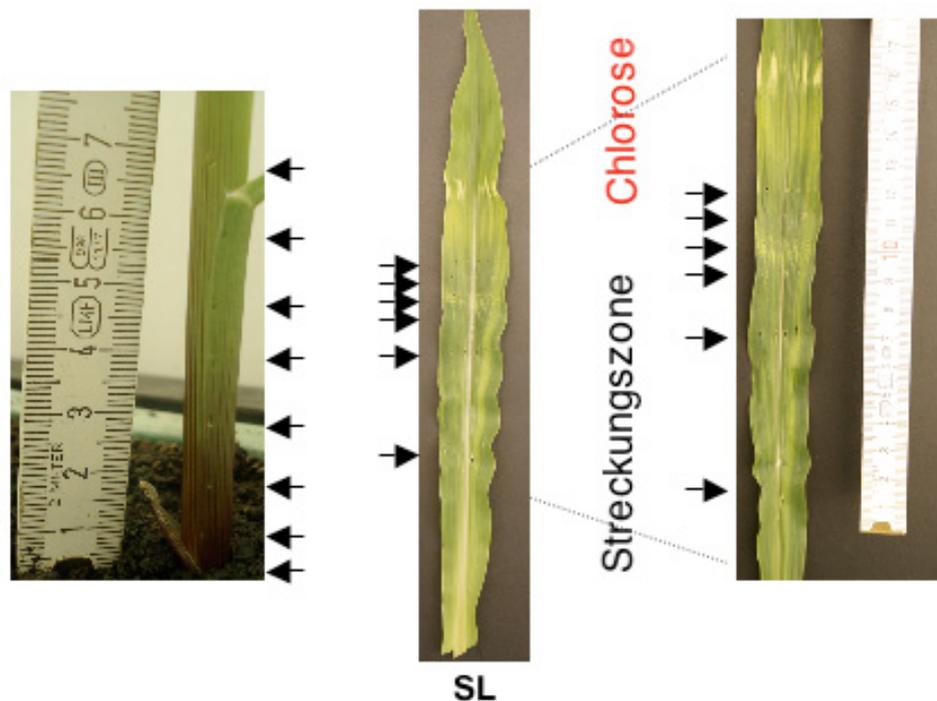


Abbildung 3-3: Lokalisierung der Blattchlorose

Die zwei Wochen alten Keimlinge wurden vor dem Kältestress mit Kanülen im Abstand von 1cm durchstoßen. Die Einstichstellen sind durch Pfeile markiert (links). In der Mitte und rechts ist das 5. Blatt der SL-Linie nach einer Woche Erholung dargestellt. Die Löcher in der Streckungszone liegen nach der Erholung im Verhältnis deutlich weiter auseinander als beim Keimling vor der Kältebehandlung und dass die Blattchlorose oberhalb der Streckungszone lokalisiert ist (mitte/rechts).

Durch ein weiteres Experiment konnte die Lokalisierung der Blattchlorose bestätigt werden. Es wurden elf bis achtzehn Tage alte Keimlinge dem Kältestress ausgesetzt und nach der Kältebehandlung phänotypisiert. Die Blattchlorosen waren in unterschiedlich alten Keimlingen in unterschiedlichen Blattzonen lokalisiert. Je älter der Keimling war, desto basaler war die Blattchlorose lokalisiert (siehe Abbildung 3-4).

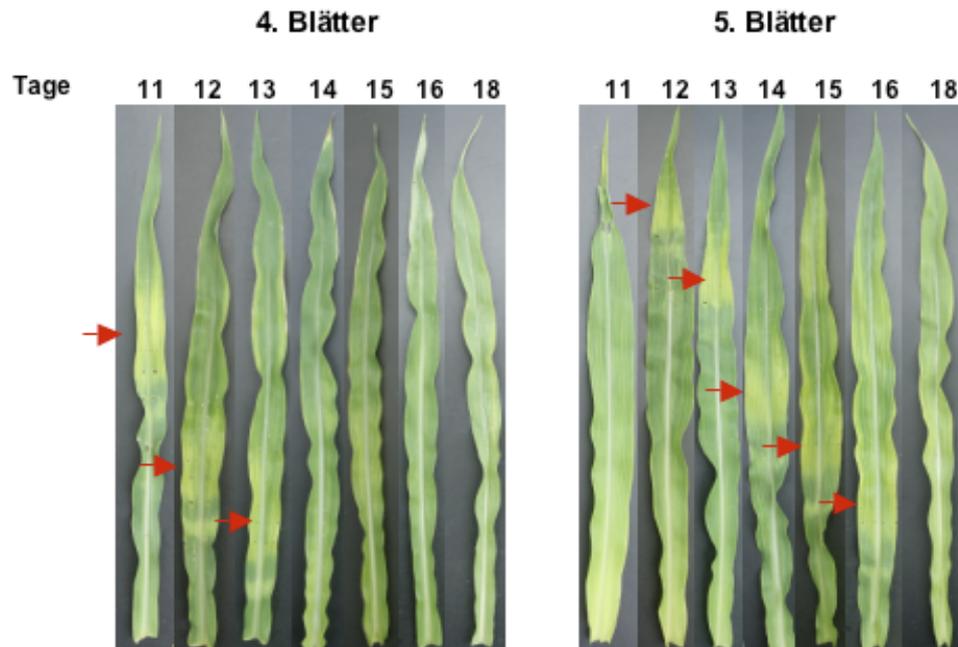


Abbildung 3-4: Die Lokalisierung der Blattchlorose in vierten und in fünften Blättern unterschiedlich alter Maispflanzen

Die elf bis achtzehn Tage alten Keimlinge (siebzehn Tage alte Keimlinge sind nicht analysiert worden) wurden der Kälte ausgesetzt, nach fünf Tagen Erholung wurden die vierten (links) und die fünften (rechts) Blätter der SL-Linie phänotypisiert. Die Blattchlorosen (mit roten Pfeilen gekennzeichnet) in unterschiedlich alten Keimlingen sind in unterschiedlichen Blattregionen lokalisiert.

Zum anderen, es war unklar, ob das Licht bei der Entstehung der Blattchlorose nach der Kältebehandlung eine Rolle spielt. Es sollte herausgefunden werden ob die später von der Chlorose betroffene Region während der Kältebehandlung noch unter den Blattscheiden verborgen oder bereits dem Licht ausgesetzt ist. Um dies herauszufinden wurden die Keimlinge mit Kanülen so durchstoßen, dass das oberste Loch hierbei die Grenze zwischen der in Blattscheide eingewickelten und der bereits dem Licht ausgesetzten Blattregion markierte (siehe Abbildung 3-5, links). Die Blätter wurden nach dem Auftritt der Blattchlorose analysiert. Die chlorotische Region befand sich unterhalb des obersten Loches (siehe Abbildung 3-5, mitte, rechts). Dadurch konnte festgestellt werden, dass die kälteempfindliche Region während des Kältestresses noch in die Blattscheide eingewickelt ist.

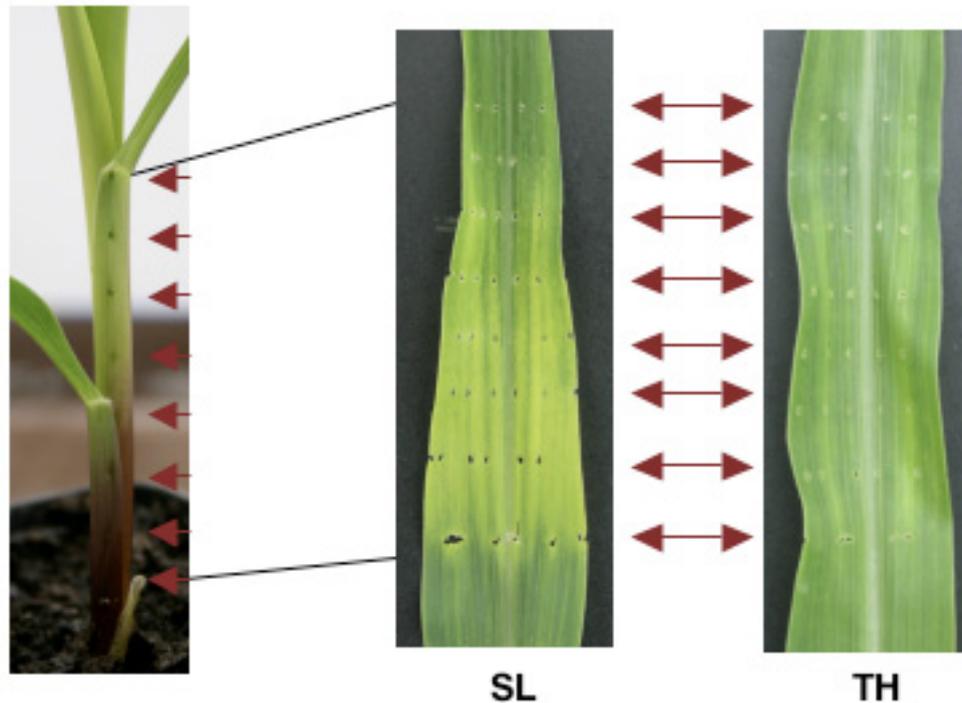


Abbildung 3-5: Lokalisierung der Blattchlorose

Die zwei Wochen alten Keimlinge wurden vor dem Kältestress mit Kanülen im Abstand von 1cm durchstoßen. Die Einstichstellen sind durch Pfeile markiert (links). In der Mitte und rechts sind die 5. Blätter der SL und TH Linie nach einer Woche Erholung dargestellt.

In den Blättern der C_4 -Pflanzen, darunter auch in Mais, sind die Leitbündel konzentrisch von den Bündelscheidenzellen umgeben, um die wiederum die Mesophyllzellen in engem Kontakt angeordnet sind (Edwards *et al.*, 2004). Es stellte sich die Frage, ob die Entwicklung der Mesophyll- und Bündelscheidenzellen in den chlorotischen und nicht chlorotischen Regionen unterschiedlich ist und ob sich die Blattregionen in denen die Blattchlorosen entstehen von den anderen Blattregionen unterscheiden. Dafür wurden die Blattquerschnitte der vierten Blätter der SL- und TH-Linien vor und nach der Kältebehandlung in bestimmten Abständen von der Erdoberfläche mikroskopisch analysiert (siehe Abbildung 3-6 A). Die Unterschiede wurden einerseits in der Blattentwicklung zwischen den kühesensitiven (SL) und kühetoleranten (TH) Linien und andererseits in der Blattentwicklung vor und nach der Kältebehandlung gesucht. Die Querschnitte der vierten Blätter vor der Kältebehandlung wurden 2 cm, 4 cm, 6 cm, 10 cm und 18 cm von der Erdoberfläche präpariert. Die Querschnitte nach der Kältebehandlung wurden 4 cm, 6 cm, 10 cm und 14 cm von der Erdoberfläche präpariert. Wie die Abbildung 3-6, A, zeigt, sind die Blätter ab 6 cm von der

Erdoberfläche morphologisch komplett entwickelt und zeigen die für C₄-Planzen typische Kranzanatomie. Die Region, wo die Blattchlorose entsteht, liegt oberhalb der 6 cm und unterscheidet sich nicht von den anderen Regionen. Die Entwicklung der Blätter vor und nach der Kältebehandlung zeigt keine Unterschiede. Es konnten auch keine Unterschiede zwischen den SL- und TH-Linien detektiert werden.

Um zu untersuchen, ob Mesophyll- und die Bündelscheidenzellen in chlorotischen Regionen voll entwickelt sind wurde nach Unterschieden zwischen den chlorotischen und nicht chlorotischen Blattregionen gesucht. Dafür wurden die Querschnitte aus chlorotischen und nicht chlorotischen Blattregionen der vierten und fünften Blätter der kühesensitiven SL-Linien analysiert (siehe Abbildung 3-6, B). Es konnten keine Unterschiede zwischen den chlorotischen und nicht chlorotischen Blatteregionen detektiert werden.

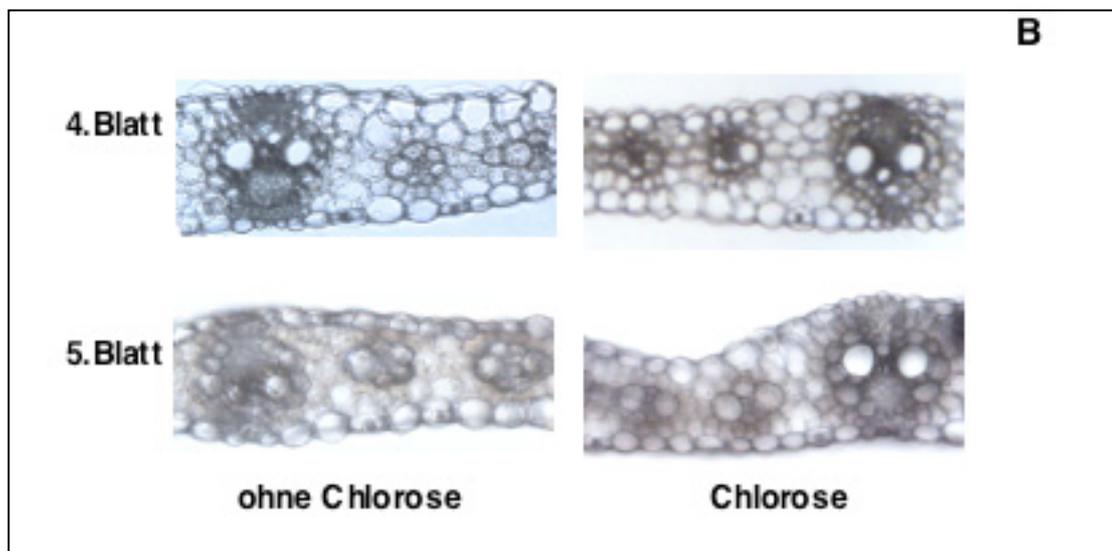
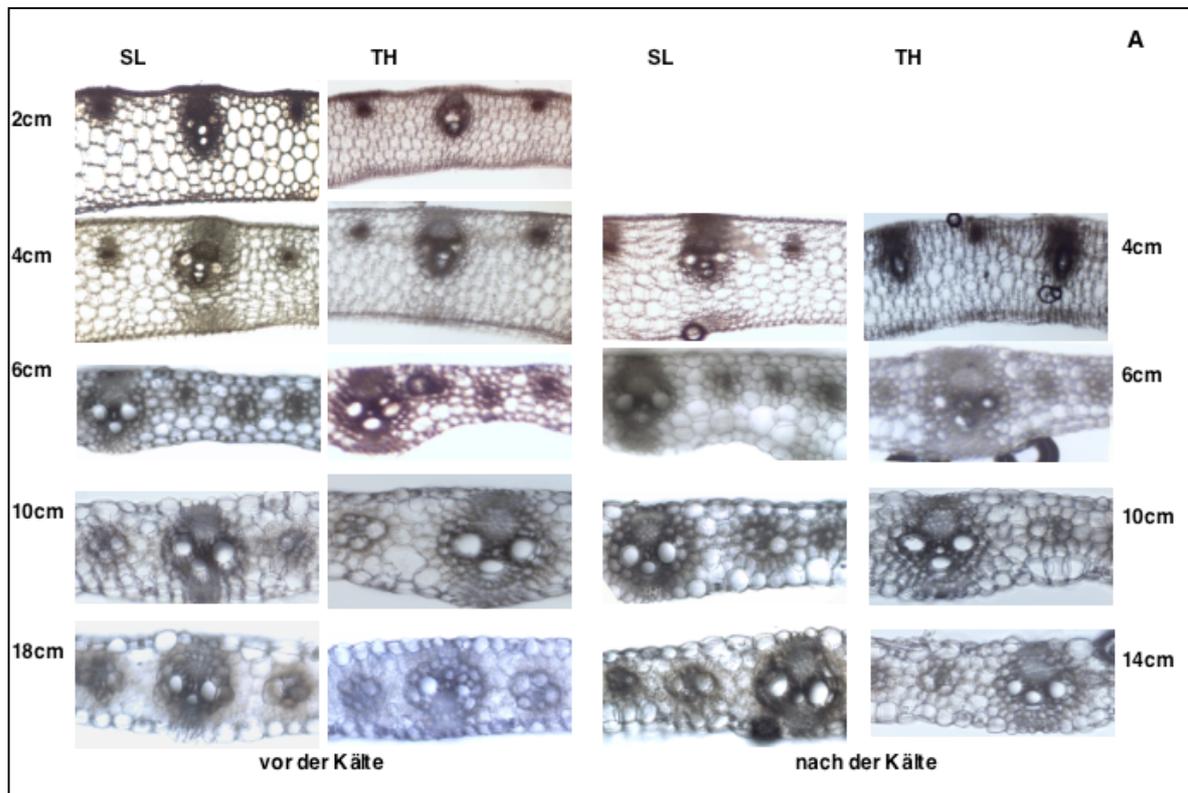


Abbildung 3-6: Mikroskopische Analyse der Blattquerschnitte der kühlesensitiven (SL) und kühletoleranten (TH) Linien (A) und chlorotischen und nicht chlorotischen Blattregionen (B).

A: Die vierten und fünften Blätter der SL- und TH-Linien wurden vor und nach der Kältebehandlung ab 2cm von der Erdoberfläche aufwärts querschnitten (dargestellt sind nur die Querschnitte der

vierten Blätter). Es wurden die Querschnitte 2, 4, 6, 10 und 18 cm über der Erdoberfläche vor der Kältebehandlung und 4, 6, 10, 14cm über der Erdoberfläche nach der Kältebehandlung analysiert.

B: Dargestellt sind die Querschnitte der chlorotischen und nicht chlorotischen Blattregionen. Querschnitte wurden nach einer Woche Erholung aus den vierten und fünften Blättern der kühesensitiven Linie (SL) präpariert.

3.2. Blattchlorose und Frischmasseertrag sind unter Kühlebedingungen genetisch gekoppelt und weisen eine negative Korrelation auf

3.2.1. Analyse der doppelhaploiden Linien (DHL)

Die Phänotypisierungen der kühesensitiven (SL) und kühetoleranten (TH) Linien hatten gezeigt, dass diese Linien unterschiedlich auf Kältestress reagieren. Die SL-Linie wies schon nach vier Tagen Erholung Blattchlorose auf. Für die Untersuchung der genetischen Basis der Kühletoleranz war wichtig, die genetische Kopplung zwischen dem Blattchlorose und dem Frischmasseertrag zu zeigen. Dafür sollte die Kartierungspopulation untersucht werden, die aus der Kreuzung zwischen kühesensitiven und kühetoleranten Linien stammte.

Um die genetische Kopplung zwischen Blattchlorose und Frischmasseertrag unter Kühlebedingungen zu untersuchen, wurden je 25 sensitive doppelhaploide Linien (DHL) mit dem niedrigsten und 25 tolerante doppelhaploide Linien mit dem höchsten Frischmasseertrag in der Klimakammer angezogen und phänotypisiert. Nach der Analyse der 25 kühesensitiven DH-Linien, zeigten 21 Linien nach der Kältebehandlung die Blattchlorose und die Markerverteilung in der QTL4-region stimmte mit der Kühlesensitivität überein (siehe Abbildung 3-7). In 19 von 25 sensitiven DH-Linien stammt die QTL4-Region aus der kühesensitiven Elterlinie.

Die Analyse der 25 kühetoleranten Linien zeigte, dass 16 Linien keine Blattchlorose aufwiesen. In 24 Linien stammte die QTL4-Region aus der kühetoleranten Elterlinie.

In insgesamt 36 von 50 analysierten DH-Linien korrelierte die Blattchlorose mit dem Frischmasseertrag. Nur 14 analysierte DH-Linien zeigten keine Korrelation.

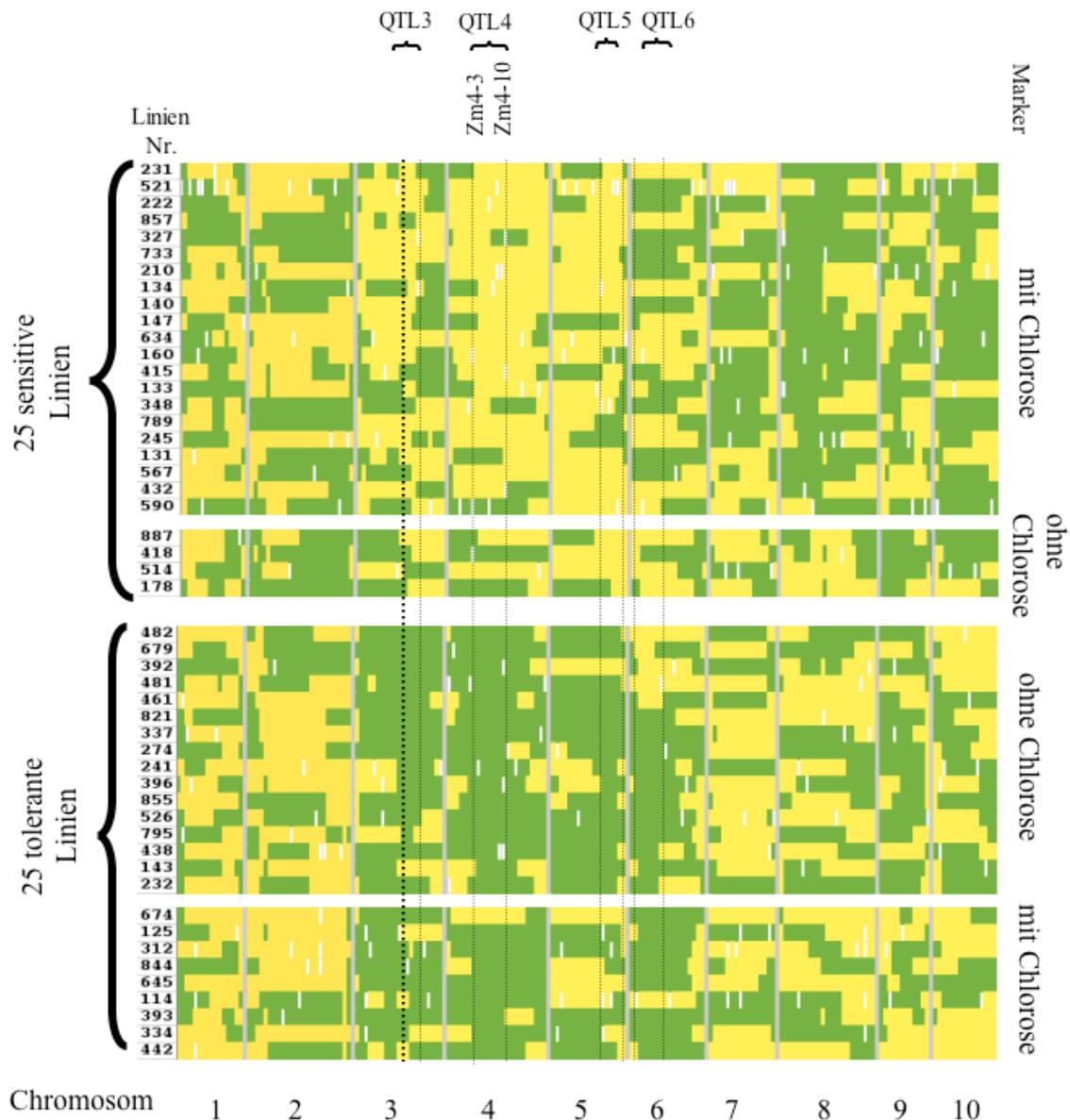


Abbildung 3-7: Die Genotypen der 25 sensitiven und der 25 toleranten DH-Linien

Zur Untersuchung der genetischen Kopplung von Blattchlorose und Frischmasseertrag wurden 25 sensitive und 25 tolerante DH-Linien analysiert. Die kühesensitiven bzw. kühetoleranten Linien sind nach ihren Phänotypen - mit oder ohne Chlorose - gruppiert. Auf den Chromosomen 3, 4, 5 und 6 sind die Frischmasse-QTLs mit den Grenzmarkern für den Frischmasseertrag markiert. Die DH-Linien sind mit entsprechenden Nummern (links) und der Markerverteilung auf zehn Chromosomen dargestellt.

Farbcode - Gelb sind die Chromosomabschnitte dargestellt, die aus der kühesensitiven Elter-Linie SL stammen, grün sind die Chromosomabschnitte aus der kühetoleranten Elter-Linie TH gekennzeichnet, weiße Chromosomabschnitte zeigen die Regionen, wo die Markerverteilung nicht bekannt ist. **Dieser Farbcode der Marker bleibt im Weiteren erhalten.**

Die Analyse der DH-Linien zeigt, dass das Auftreten der Blattchlorose mit den geringen Frischmasseleistungen im Feld korreliert, die Blattchlorose und der Frischmasseertrag

genetisch miteinander gekoppelt sind und die QTL4-Region für den Frischmasseertrag eine wichtige Rolle bei der Ausbildung der Kühltoleranz spielt.

3.2.2. Analyse der nahe isogenen Linien (NIL)

Aufgrund der oben beschriebenen Korrelation zwischen Frischmasseertrag und Blattchlorose, wurde vermutet, dass die gekoppelt vererbt werden. Um dies zu bestätigen wurden nahe isogene Linien (NIL) analysiert. Die NI-Linien wurden bei der KWS hergestellt. Die NI-Linien stammen von einer DH-Linie (DH526), die mehrmals zum kühesensitiven Elter (SL) rückgekreuzt wurde um das TH Anteil zu verkleinern und anschließend geselbstet worden waren. Durch markerbasierte Selektion wurde die QTL4-Region in homozygoten Zustand mit einem kühesensitiven Hintergrund gebracht (Wilde *et al.*, 2005). Der Frischmasseertrag der NI-Linien wurde unter Feldbedingungen bestimmt. In hier vorliegende Arbeit wurden 15 NI-Linien, die sich in den Frischmasseertrag unterscheiden, analysiert (siehe Tabelle 3-1).

LINIE	FRISCHMASSE (g/Pflanze 2009)	FRISCHMASSE (g/Pflanze 2006)
SL	46,96	81,66
TH	85,54	100,01
NI-Linien		
TH-N4-2X		88,8
TH-N4-3X	64,39	
TH-N4-4X	58,56	
TH-N4-5X	69,37	
TH-N4-6X	59,27	
TH-N4-7X		87,1
TH-N4-8X	65,66	
TH-N4-9X	55,18	
TH-N4-10X	59,21	
TH-N4-12X	70,40	
TH-N4-13X	68,64	
TH-N4-14X	64,30	
TH-N4-15X	63,33	
TH-N4-16X	75,61	
TH-N4-17X	61,27	

Tabelle 3-1: Frischmasseleistungen der SL-, TH-, und NI-Linien.

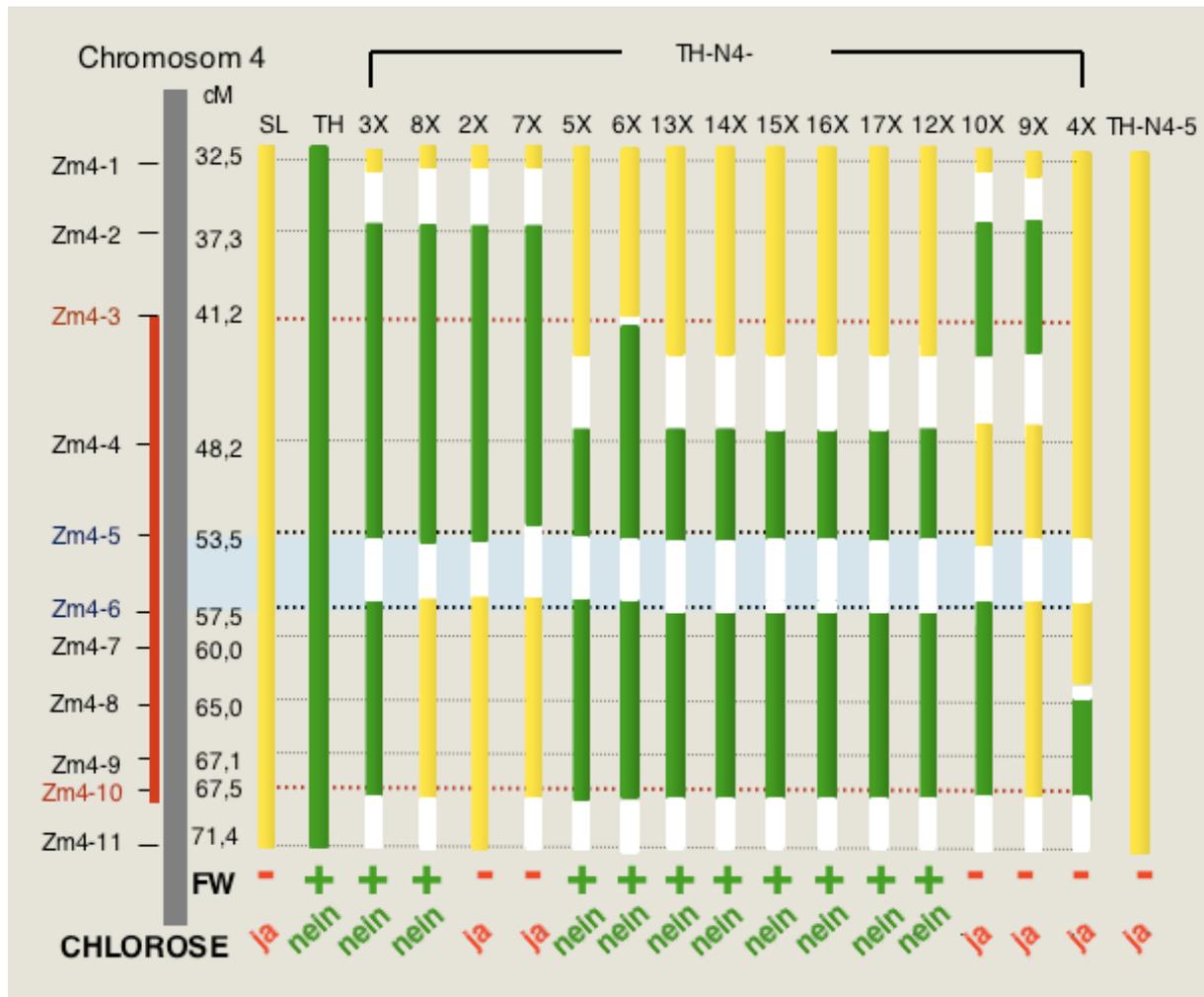


Abbildung 3-8: Die Genotypen der SL-, TH- und NI-Linien. Chromosom 4 ist links mit kartierten Markern dargestellt. Die Region zwischen den Markern Zm4-3 und Zm4-10 ist rot dargestellt und weist Frischmasse-QTL auf. Es wurden SL-, TH- und fünfzehn NI-Linien phänotypisiert, als Kontrolle wurde eine NI-Linie mit der QTL-Region für Frischmasse auf dem Chromosom 5 (TH-N5) genutzt. (Farbcode siehe Legende Abbildung 3-7). Frischmasseleistungen (mit „+“ ist hohe Frischmasseleistung, mit „-“, ist niedrige Frischmasseleistung gekennzeichnet) und die Phänotypen („ja“ weist auf chlorotischen Phänotyp, „nein“ weist auf nicht chlorotischen Phänotyp) sind jeweils unterhalb der Linien angegeben. Mit dem blauen Hintergrund ist die QTL4-Region für den Frischmasseertrag dargestellt, die durch die Phänotypisierungen der NI-Linien zwischen den Markern Zm4-5 und Zm4-6 eingengt wurde

Die phänotypische Analyse der NI-Linien zeigte, dass tatsächlich nur die NI-Linien, die im Feld hohe Frischmasseleistungen erbracht hatten, keinen chlorotischen Phänotyp aufwiesen. Die NI-Linien, die im Feldversuch niedrige Frischmasseleistungen erbrachten, zeigten nach der Kältebehandlung die Blattchlorosen (siehe Abbildung 3-8). Nach den Phänotypisierungen der Elter-Linien (SL, TH), NI-Linien und der Linie TH-N5 mit der QTL für den Frischmasseertrag auf dem Chromosom 5 (als Kontrolle) konnte die Korrelation zwischen

dem Blattchlorose-Locus und dem Frischmasse-QTL auf dem Chromosom 4 bestätigt werden. Die gesamte QTL4-Region liegt zwischen den Markern Zm4-3 und Zm4-10 und umfasst ca. 26 cM (siehe Abbildung 3-8). Um es herauszufinden, wo im 26 cM großen Bereich sich der Frischmasse-QTL und der Blattchlorose-Locus befinden, wurden die NI-Linien weiter untersucht. Als erstes sind die Linien TH-N4-3X und TH-N4-8X untersucht worden. Diese Linien weisen keinen chlorotischen Phänotyp nach der Kältebehandlung auf und zeigen hohen Frischmasseertrag. Aufgrund des Vergleiches der Markerverteilungen und der phänotypischen Analyse konnte die QTL4-Region zwischen den Markern Zm4-3 und Zm4-6 eingeengt werden. Die NI-Linien TH-N4-10X und TH-N4-5X unterscheiden sich in ihren Frischmasseertrag und Phänotyp (siehe Abbildung 3-8). Die Region zwischen Zm4-4 und Zm4-5 der toleranten Linie TH-N4-5X stammt aus der kühletoleranten TH-Linie und dieselbe Region der sensitiven TH-N4-10X-Linien stammt aus der kühesensitiven SL-Linie. Dadurch konnte QTL4 weiter zwischen den Markern Zm4-4 und Zm4-6 eingeengt werden.

Für die weitere Einengung der QTL4-Region wurden drei NI-Linien TH-N4-2X, TH-N4-8X und TH-N4-10X analysiert. TH-N4-2X und TH-N4-8X zeigen die gleiche Markerverteilung in der QTL4-Region, den Unterschied stellt nur die Region zwischen den Markern Zm4-5 und Zm4-6 dar. Für diese Region ist die Markerverteilung unbekannt (auf der Abbildung 3-8 weiß dargestellt). Diese zwei NI-Linien unterscheiden sich in ihrem Frischmasseertrag und ihrem Phänotyp nach dem Kältestress. Die Markerverteilung in der QTL4-Region der Linien TH-N4-10X zeigt, dass der Chromosom-Abschnitt zwischen den Markern Zm4-4 und Zm4-5 aus der kühesensitiven SL-Linie stammt und der Chromosom-Abschnitt zwischen den Markern Zm4-6 und Zm4-10 aus der kühletoleranten Elter-Linie TH. Die Pflanzen dieser Linie weisen nach der Kältebehandlung die Blattchlorose auf. Nach der Analyse der drei NI-Linien konnte die QTL4-Region zwischen den Markern Zm4-5 und Zm4-6 kartiert und auf 4cM eingeengt werden (auf der Abbildung 3-8 ist diese Region mit blauem Hintergrund dargestellt).

3.3. Die Entwicklung molekularer Marker für die QTL-Region auf dem Chromosom 4

Augrund der Korrelation zwischen den Blattchlorose und Frischmasseertrag der NI-Linen wurde die QTL4-Region zwischen den Markern Zm4-5 (Contig 164) und Zm4-6 (Contig 181) kartiert. Obwohl diese Region nur 4cM umfasst sind die Marker Zm4-5 und Zm4-6 (nach physikalischer Karte aus der Datenbank www.maizesequence.org) ca.122Mb auseinander entfernt: der Marker Zm4-5 kartiert auf dem Contig 164 und liegt bei 36,72Mb, während der Marker Zm4-6 auf dem Contig 181 kartiert und bei 158,72Mb liegt. Die QTL4-Region macht fast die Hälfte des 247Mb großen Chromosoms 4 aus. Für die weitere Kartierung des Frischmasse-QTL war die Markerentwicklung auf dem Chromosom 4 notwendig. Dafür wurden zwei Strategien verfolgt: die Markerentwicklung auf Basis der in der Datenbank (www.maizesequence.org) vorhandenen Maissequenzen, sowie die Markerentwicklung durch AFLP-Analyse.

3.3.1. Die Markerentwicklung aufgrund vorhandener Genomsequenzen

Für die Markerentwicklung der QTL4-Region wurden in der Datenbank www.maizesequence.org (Version 2007/08) vorhandenen Genomsequenzen der Maislinie B73 analysiert. Dafür wurden aus jedem Contig zwischen 164 und 182 stichprobenartig 137 BACs ausgewählt (siehe Abbildung 3-9 und Tabelle 3-2). Um die Retrotransposon-freien Genomabschnitte analysieren zu können, wurden die Retrotransposons in den BAC-Sequenzen mit dem in der Datenbank (www.repeatmasker.org) vorhandenen Programm maskiert. Die „single copy“-Regionen wurde nach SSR-Markern durchsucht und die Intronbereiche als Quelle von Polymorphismen untersucht.

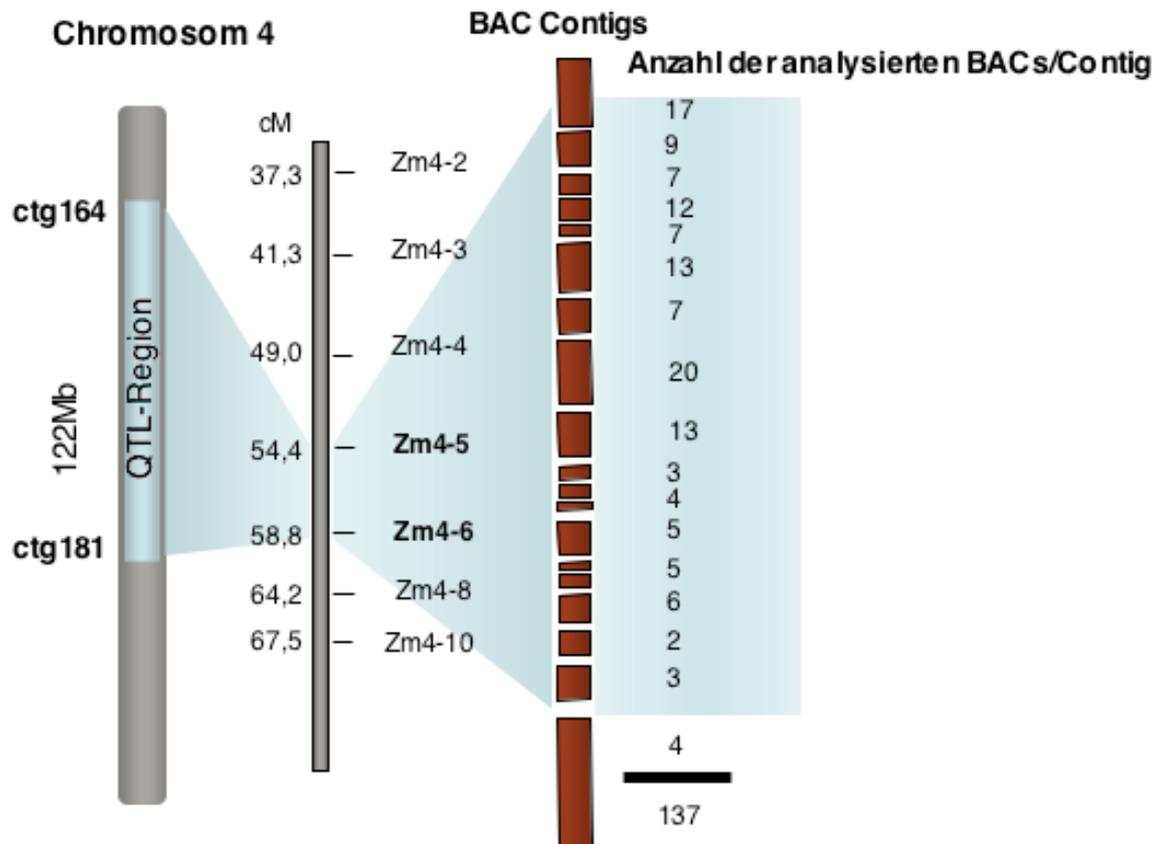


Abbildung 3-9: Vergleich der physikalischen (links) und genetischen (mitte) Karte des Chromosoms 4. Nach der physikalischen Karte beträgt der Abstand zwischen den Markern Zm4-5 und Zm4-6 122Mb (links), während nach der genetischen Karte (mitte) die zwei Marker 4cM auseinander liegen. Für die Markerentwicklung wurden BACs aus Contigs zwischen 164 bis 182 ausgewählt (rechts).

54% der analysierten BACs enthielten SSR. Es wurden 94 spezifische Primer-Paare entwickelt. Nach der Analyse der Sequenzen konnten zwei Marker entwickelt werden. Der erste Marker HHU-Zm1 konnte außerhalb des Mikrosatelliten-Bereiches entwickelt werden und stellt einen InDel-Marker dar. SL- und TH-Linien unterscheiden sich in einem 32 bp großes Fragment, welches in der SL Linie deletiert ist. Die Kartierung erfolgte sowohl durch alle NI-Linien als auch diejenige DH-Kartierungs-Population, die für die Kartierung der vorherigen Marker bei der KWS genutzt worden war. Dieser Marker konnte auf dem Chromosom 4 kartiert werden (siehe Abbildung 3-10). HHU-Zm4-1 liegt gemäß physikalischer Karte (basiert auf der Datenbank www.maizesequence.org) bei 32Mb und damit oberhalb des Markers Zm4-5 (36,7Mb). Der zweite Marker HHU-Zm4-4 ist ein SSR-Marker. Der Unterschied zwischen SL- und TH-Linien liegt im Mikrosatellit (TAT)₂₁: SL

enthält (TAT)₆ mehr als die TH-Sequenz ((TAT)₁₅). Obwohl das BAC, woraus der Marker entwickelt worden war, nach der Datenbank auf dem Chromosom 4 Contig 167 liegt, wurde der Marker auf Chromosom 7 kartiert.

BAC Contig	Contig Größe (Mb)	Analysierte BACs (Zahl)	Sequenzierte Fragmente (Zahl)	Sequenzierte Fragmente (Kb)
164	17	17	8	4,137
165	7	9	1	0,583
166	5	7	6	3,060
167	6	12	2	0,624
168	3	7	5	2,370
169	9	13	2	0,880
170	7	7	4	1,553
171	15	20	7	3,111
172	10	13	2	0,322
173	4	3	-	-
174	2	2	-	-
175	3	2	-	-
176	8	5	-	-
177	2	2	3	1,915
178	2	3	-	-
179	7	6	2	0,815
180	6	2	-	-
181	7	3	1	0,634
182	22	4	1	0,370
insgesamt	133	137	44	20,374

Tabelle 3-2: Verteilung der analysierten BACs auf den Contigs und die Darstellung der analysierten Sequenzen in Zahl und Größe.

Nur 23% der analysierten BACs enthielten Gene. Für die Entwicklung der Marker aus dem Intronbereich wurden 65 Primer-Paare entwickelt. Durch die Analyse der Intronbereiche konnten zwei Marker entwickelt werden (siehe Abbildung 3-10). Der erste Marker davon,

HHU-Zm4-2, liegt auf dem gleichem BAC wie der Marker HHU-Zm4-1 und stellt einen CAPS-Marker mit einer *NsiI* Schnittstelle in der SL-Linie dar. In TH ist die Schnittstelle durch den Nukleotidaustausch nicht mehr vorhanden. Der HHU-Zm4-2 kartiert, wie auch der HHU-Zm4-1, oberhalb des Zm4-5, und daher auch oberhalb der QTL4-Region.

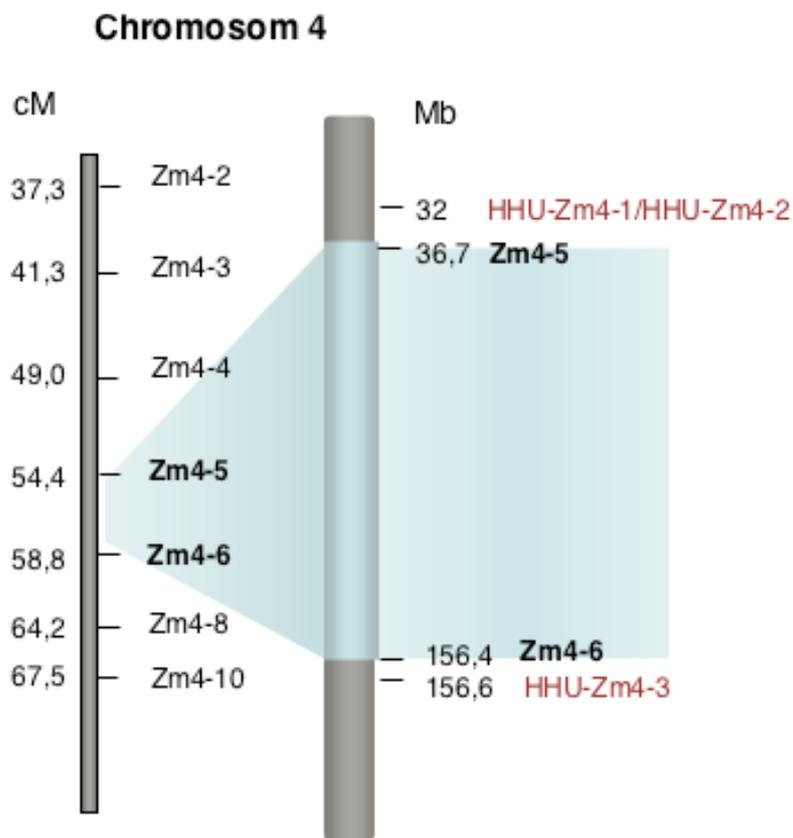


Abbildung 3-10: neu entwickelte Marker auf dem Chromosom 4.

Links ist die genetische Karte und rechts die physikalische Karte des Chromosoms 4 dargestellt. Drei neue Marker (rot dargestellt) konnten auf dem Chromosom 4 kartiert werden. Die Marker HHU-Zm4-1 und HHU-Zm4-2 (32 Mb) liegen auf einem BAC und kartieren oberhalb des Markers Zm4-5 (36,7 Mb); der Marker HHU-Zm4-3 (156,6 Mb) kartiert unterhalb des Markers Zm4-6 (156,4 Mb). Die Mb-Angaben basieren auf www.maizesequence.org 06/2010.

Der zweite Marker HHU-Zm4-3, der durch die Analyse eines Intron-Bereiches entstanden ist, ist auch ein CAPS-Marker mit der *SspI* Schnittstelle in der SL-Linie. Die Schnittstelle ist in TH durch den Nukleotidaustausch nicht vorhanden. Der HHU-Zm4-3 Marker konnte auf dem Chromosom 4 - allerdings unterhalb der Marker Zm4-6 - kartiert werden (siehe Abbildung 3-10). Der Marker Zm4-6 kartiert bei 156,4 Mb (Angabe www.maizesequence.org 2010), während der Marker HHU-Zm4-3 auf 156,6 Mb kartiert.

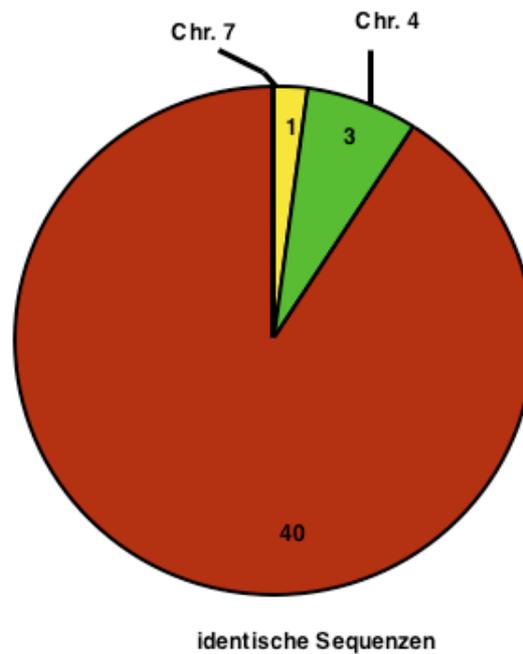


Abbildung 3-11: Aus 44 analysierten Sequenzen weisen nur vier Sequenzen Polymorphismen zwischen den SL und TH auf.

Durch die Analyse der Mikrosatelliten und Intron-Bereiche konnten vier Marker entwickelt werden, drei davon kartieren auf dem Chromosom 4 und ein Marker kartiert auf dem Chromosom 7. 40 Sequenzen sind identisch zwischen SL und TH Linien.

40 von 44 analysierten Fragmenten und insgesamt ca.19 Kb wiesen keine Polymorphismen zwischen den SL- und TH-Linien auf (siehe Abbildung 3-11). Die vier polymorphen Fragmente konnten zur Marker entwickelt werden (siehe Abbildung 3-10, 3-11). Da keiner der neu entwickelten Marker in der Region zwischen Zm4-5 und Zm4-6 kartierte, konnte der Frischmasse-QTL auf dem Chromosom 4 nicht eingengt werden. Deshalb war notwendig, eine weitere Methode für die Markerentwicklung zu verfolgen.

3.3.2. Die Markerentwicklung durch AFLP-Analyse

Da für die Markerentwicklung durch AFLP-Analyse keine Sequenzinformationen notwendig sind, wurde als zweite Strategie zur Einengung der QTL4-Region diese Methode ausgewählt und durch die Firma „Keygene“ im Auftrag durchgeführt. Die AFLP-Analyse wurde mit den Elternlinien SL und TH und verschiedenen NI- und subNILs (sub-nahe-isoegene-Linien (subNILs) werden in Kapitel 3-5 angesprochen), durchgeführt (siehe Abbildung 3-12).

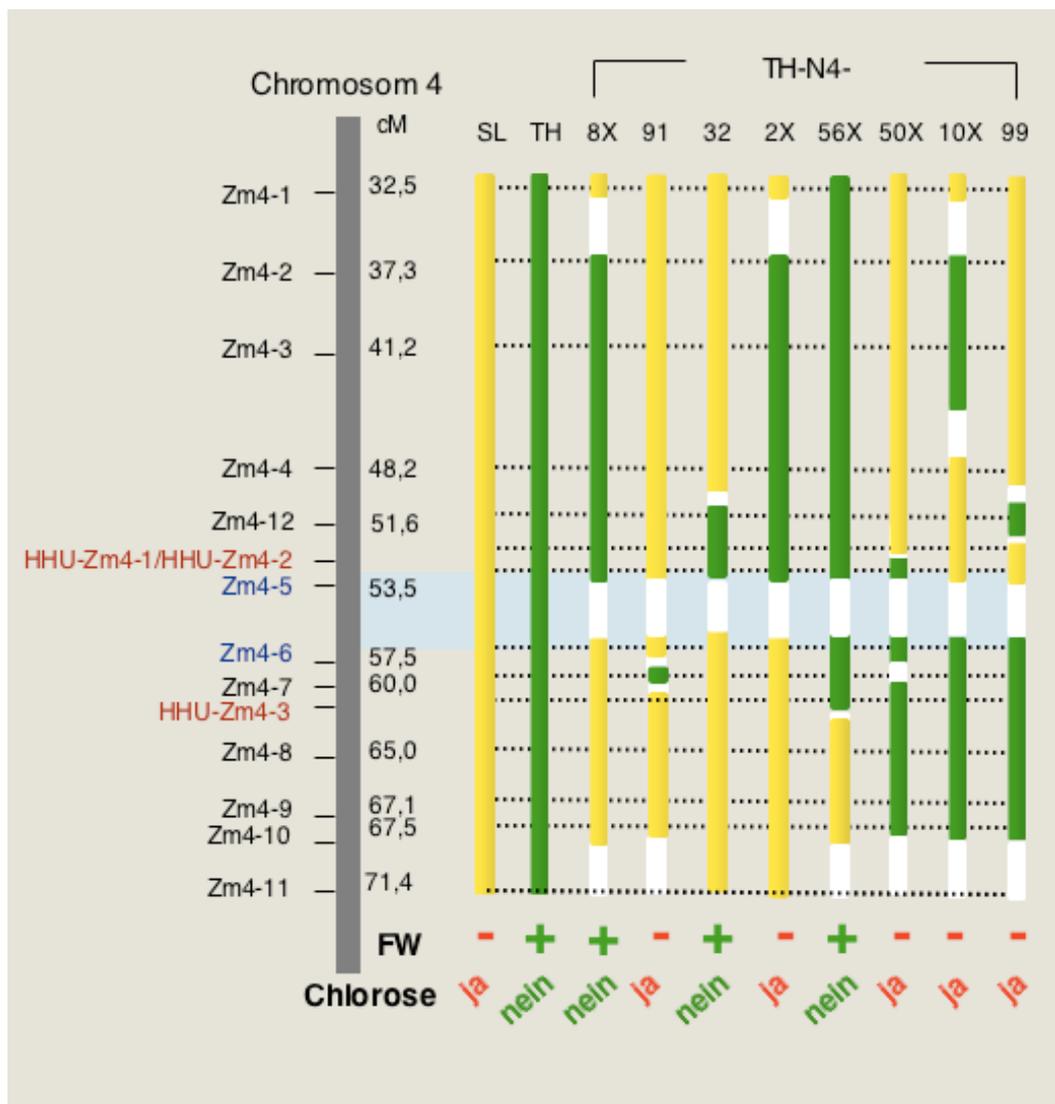


Abbildung 3-12: für die AFLP-Analyse ausgewählte Linien.

Links ist die genetische Karte des Chromosoms 4 mit Markern dargestellt. Mit blauem Hintergrund ist die QTL4-Region gekennzeichnet. Für die AFLP-Analyse wurden neben den Elternlinien 8 NI-Linien ausgesucht. Unter jeder Linie ist die Frischmasse-Leistung der Linie dargestellt. Mit „-“ ist niedrige Frischmasse und mit „+“ hohe Frischmasse gekennzeichnet. (Farbcode der Marker siehe Legende Abbildung 3-7).

Für die AFLP-Analyse wurde sowohl tolerante als auch sensitive Linien ausgewählt, die unterschiedliche Genotypen aufweisen. Es ist unklar wie die Markerverteilung in der QTL4-Region ist (auf der Abbildung 3-12 mit blauem Hintergrund dargestellt). Die ausgewählten NI-Linien unterscheiden sich im Frischmasseertrag und im chlorotischen Phänotyp nach der Kältebehandlung. Die AFLP-Analyse wurde in zwei Phasen durchgeführt. Als erstes wurden die Elter-Linien SL und TH und drei NI-Linien TH-N4-8X, TH-N4-91 und TH-N4-32 ausgesucht (siehe Abbildung 3-12). Diese Linien haben unterschiedlich große QTL-Regionen und unterscheiden sich in Phänotypen nach der Kältebehandlung. Bei *Keygene* wurden für die Markerentwicklung 188 Primer-Kombinationen (112 *EcoRI/MseI* und 76 *PstI/MseI*) getestet. Dadurch wurden 3008 polymorphe Fragmente zwischen SL- und TH-Linien sowie 76 polymorphe Fragmente zwischen SL- und NI-Linien detektiert (siehe Abbildung 3-13). Die Marker wurden auf unterschiedlichen Chromosomen, darunter Chromosom 3, 4, 6, 8, 9 und 10 kartiert. Nur 10 aus 76 Marker wurden dem Chromosom 4 zugeordnet. Für die Markerentwicklung wurden 39 Fragmente zum Sequenzieren ausgewählt - darunter die Fragmente, die auf dem Chromosom 4 und unterhalb des Markers Zm4-5 kartierten und Rekombinationen zwischen den Linien zeigten. Darunter wurden zwei Fragmente, die auf dem Chromosom 8 und 9 kartierten, zur Sequenzierung ausgewählt (siehe Abbildung 3-13). Bei *Keygene* konnten aus den ausgewählten 39 AFLP Fragmenten 27 Fragmente sequenziert werden. Aufgrund der AFLP-Analyse mit den oben beschriebenen Linien SL, TH, TH-N4-8X, TH-N4-91 und TH-N4-32 konnte die QTL4-Region nicht eingengt werden. Es wurden weitere fünf Linien TH-N4-2X, TH-N4-56X, TH-N4-50X, TH-N4-10X, TH-N4-99 für die AFLP-Analyse einbezogen (siehe Abbildung 3-12).

I MARKER	II CHR.	III cM	IV TH-N4-					V	VI
			SL	TH	8X	91	32		
E32/M48-F-590<N>	unbekannt								
E32/M49-F-591	unbekannt								
E32/M53-F-162<N>	unbekannt								
E32/M54-F-257	unbekannt								
E32/M61-F-145<N>	unbekannt								
E33/M48-F-212	unbekannt							Zm4-3 (41,3cM)	
E33/M56-F-080	unbekannt								
E35/M48-F-193	unbekannt								
E35/M51-F-497	chrom_4	47.0						Zm4-2	
E35/M55-F-358<N>	unbekannt								
E35/M57-F-219	unbekannt								
E38/M53-F-258<N>	unbekannt								
E39/M49-F-159<N>	chrom_10	33.0							
P18/M59-F-452	chrom_4	45.2							
E39/M51-F-125	chrom_4	45.4							
P13/M48-F-186	chrom_4	48.7							
E39/M54-F-108	chrom_4	54.7							
E39/M59-F-210<N>	chrom_3	53.3							
P12/M51-F-262<N>	unbekannt								
P12/M51-F-460<N>	unbekannt								
P12/M54-F-348<N>	unbekannt								
P13/M56-F-107<N>	unbekannt								
P18/M58-F-419<N>	unbekannt								
P19/M54-F-209<N>	unbekannt						X		
P18/M60-F-371	chrom_6	47.6						Zm4-4 (47,9cM)	
E33/M52-F-595<N>	unbekannt						X		
E33/M58-F-410	unbekannt						X		
E38/M47-F-331	chrom_4	49.2					X	Zm4-14 (53,2cM)	
E33/M60-F-550	chrom_4	55.4					X	Zm4-15 (52,6cM)	
P12/M59-F-244	chrom_4	55.6					X	Zm4-5	
P18/M59-F-586	chrom_4	55.8					X		
E33/M50-F-264	chrom_4	55.9					X		
E35/M48-F-077	unbekannt						X		
E42/M58-F-101<N>	unbekannt						X		
E45/M47-F-166<N>	unbekannt						X		
P12/M51-F-238<N>	unbekannt						X		
P12/M51-F-429<N>	unbekannt						X		
P12/M51-F-571<N>	unbekannt						X		
P12/M53-F-521<N>	unbekannt						X		
P19/M51-F-245<N>	unbekannt						X		
P19/M51-F-247<N>	unbekannt						X		
E32/M56-F-219<N>	unbekannt						X		
E33/M51-F-250	chrom_9	87.5					X		
E39/M52-F-278<N>	unbekannt						X		
E39/M52-F-333<N>	unbekannt						X		
E39/M56-F-367<N>	unbekannt						X		
E45/M54-F-133<N>	unbekannt						X		
E45/M54-F-512<N>	unbekannt						X		
E45/M54-F-515<N>	unbekannt						X	nicht identifiziert	
P12/M52-F-381<N>	unbekannt						X		
P15/M57-F-268<N>	unbekannt						X		
P18/M54-F-235<N>	unbekannt						X		
P19/M49-F-150<N>	unbekannt						X		
P19/M49-F-197<N>	unbekannt						X		
P12/M53-F-242<N>	unbekannt						X		
P12/M54-F-516<N>	unbekannt						X		
P12/M55-F-096<N>	unbekannt						X		
P13/M50-F-245	unbekannt						X		
P13/M60-F-155<N>	unbekannt						X		
P18/M58-F-169<N>	unbekannt						X		
P19/M49-F-191<N>	unbekannt						X		

I	II	III	IV	TH-N4-	V	VI
MARKER	CHR.	cM	SL TH 8X 91 32			
P12/M51-F-064<N>	unbekannt		■ ■ ■ ■ ■			
P12/M51-F-578<N>	unbekannt		■ ■ ■ ■ ■			
P12/M53-F-191<N>	unbekannt		■ ■ ■ ■ ■			
P12/M54-F-295<N>	unbekannt		■ ■ ■ ■ ■			
P12/M57-F-063<N>	unbekannt		■ ■ ■ ■ ■			
P13/M49-F-227<N>	chrom_8	75.0	■ ■ ■ ■ ■		X	
P18/M53-F-182<N>	unbekannt		■ ■ ■ ■ ■			
P18/M53-F-185<N>	unbekannt		■ ■ ■ ■ ■			
E38/M59-F-369	unbekannt		■ ■ ■ ■ ■			
P12/M53-F-142<N>	unbekannt		■ ■ ■ ■ ■			
P12/M54-F-511<N>	unbekannt		■ ■ ■ ■ ■			
P12/M56-F-111<N>	unbekannt		■ ■ ■ ■ ■			
P12/M57-F-237<N>	unbekannt		■ ■ ■ ■ ■			
P13/M59-F-207	chrom_9	20.	■ ■ ■ ■ ■		X	
P18/M52-F-226<N>	unbekannt		■ ■ ■ ■ ■			

Abbildung 3-13: durch AFLP-Analyse entwickelte Marker.

Es konnte 76 Fragmente detektiert werden, die Polymorphismen zwischen den NI-Linien und Elter-Linien aufwiesen, in der erste Reihe sind die 76 Marker dargestellt; die zweite Reihe stellt die Chromosomen dar, auf denen Marker eingeordnet werden konnten; die dritte Reihe zeigt die Position der Marker in cM; farbig sind die analysierten Linien dargestellt: 1: SL; 2: TH; 3: TH-N4-8X, 4: TH-N4-91, 5: TH-N4-32. Die vierte Reihe zeigt die zur Sequenzierung ausgewählten 39 Marker. Die Marker, die aus der kühesensitiven Elter-Linie (SL) stammen, sind gelb gezeichnet, die aus der toleranten Elter-Linie (TH) stammende Marker sind grün gezeichnet. Rechts im Klartext beschriebene Marker sind auf dem Chromosom 4 bei der KWS kartierte Marker. Die mit hellblauem Hintergrund markierten acht Marker wurden dem Chromosom 8 zugeordnet, die mit pinkem Hintergrund markierten sieben Marker wurden dem Chromosom 9 zugeordnet.

Die Datenbankanalyse der sequenzierten AFLP-Fragmente zeigte, dass die Fragmente physikalisch auf unterschiedlichen Chromosomen kartieren, nur sechs Fragmente kartieren auf dem Chromosom 4 (siehe Abbildung 3-14).

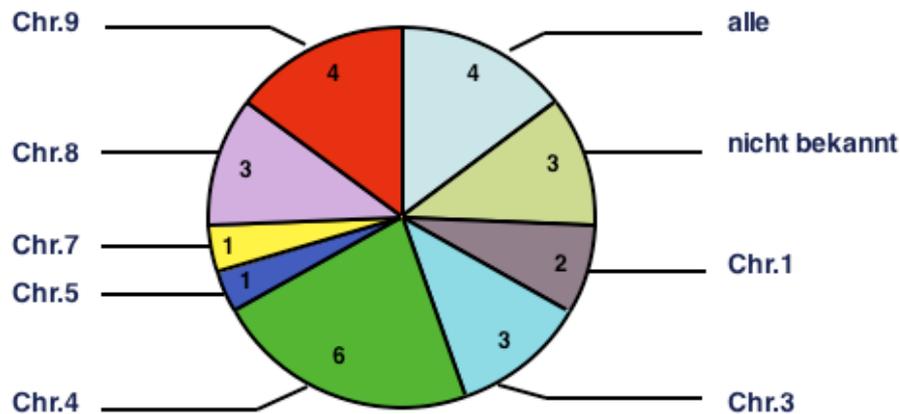


Abb.3-14: Verteilung der AFLP-Sequenzen im Genom.

Nach den Sequenzanalysen der 27 sequenzierten AFLP-Fragmente konnten die Fragmente physikalisch unterschiedlichen Chromosomen kartiert werden. Die Zahlen im Kreisdiagramm zeigen die Anzahl der kartierten Sequenzen auf unterschiedlichen Chromosomen.

Da die AFLP-Marker dominanten Marker darstellen, wurde es versucht die in codominante CAPS oder InDel Marker umzuwandeln. Aus diesem Grunde wurden für die sequenzierten AFLP-Fragmente 97 spezifische Primer-Paare entwickelt und getestet. Während der Markerentwicklung wurden insgesamt 12,5Kb sequenziert. Es konnten mittels sequenzierten AFLP-Fragmenten zehn Marker entwickelt werden. Davon konnten nur drei auf dem Chromosom 4 kartiert werden, sieben Marker wurden auf anderen Chromosomen kartiert (siehe Abbildung 3-15). Wie die Abbildung 3-15 zeigt, kartieren vier Marker auf dem Chromosom 9 und jeweils ein Marker auf den Chromosomen 1, 5, und 6. Drei von vier auf dem Chromosom 9 kartierten Markern kartieren innerhalb von ca. 5,3Mb. Diese dichte Einordnung der kartierten Marker deutet darauf hin, dass auf Chromosom 9 ein kleiner Stück aus der kühetoleranten Elter-Linie TH stammt. Dass drei Marker auf den Chromosomen 1, 5, und 6 kartiert werden konnten, deutet darauf hin, dass entweder TH-Stücke auch auf den Chromosomen 1, 5 und 6 sein können, oder die Primer für die Markerentwicklung wurden nicht spezifisch gelegt.

Die drei Marker, die auf dem Chromosom 4 kartieren, sind CAPS-Marker. Der Marker HHU-Zm4-5 ist ein CAPS-Marker mit einer *AluI* Schnittstelle in der SL-Linie. Diese Schnittstelle ist in der TH-Linie durch den Nukleotidaustausch nicht mehr vorhanden. Der Marker HHU-Zm4-7 ist ebenfalls ein CAPS-Marker mit einer *RsaI* Schnittstelle, diese Schnittstelle ist in der TH-Linie nicht vorhanden. Der Marker HHU-Zm4-6 stellt ebenfalls einen CAPS-Marker mit *BfaI* Schnittstelle in TH dar (siehe Abbildung 3-16, die neu entwickelten Marker sind grün dargestellt).

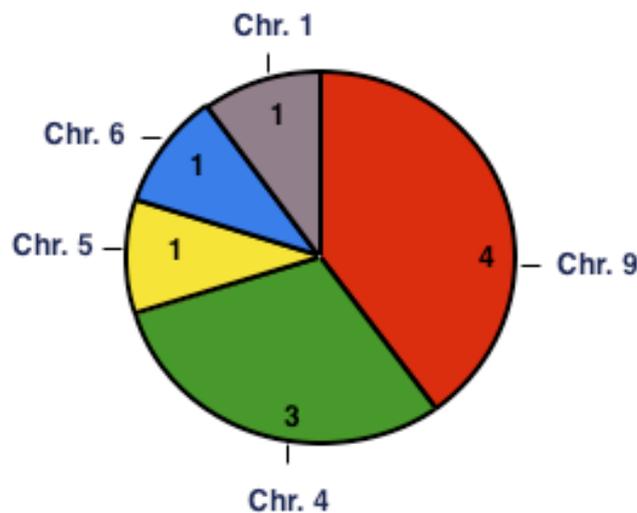


Abbildung 3-15: die durch AFLP-Analyse entwickelten Marker kartieren auf verschiedenen Chromosomen. Nur drei Marker konnten auf dem Chromosom 4 kartiert werden, vier Marker kartieren auf dem Chromosom 9 und jeweils ein Marker kartiert auf den Chromosomen 1, 5 und 6.

Erneut konnte keiner der neu entwickelten Marker zwischen Zm4-5 und Zm4-6 kartiert werden und dadurch konnte die QTL4-Region nicht weiter eingengt werden. In der Zwischenzeit waren vier weitere Marker 44P23/24, 44P35/36, Zm139F/P50 und 44P12/13 für die QTL4-Region entwickelt worden (K. Ernst, unveröffentlicht) und für die Kartierung zur Verfügung gestellt. Diese Marker sind auf einem BAC lokalisiert und konnten unterhalb des Markers Zm4-5 (37,7Mb) kartiert werden. Der Abstand zwischen den Markern Zm4-5 und 44P23/24 beträgt ca. 400Kb (siehe Abbildung 3-16).

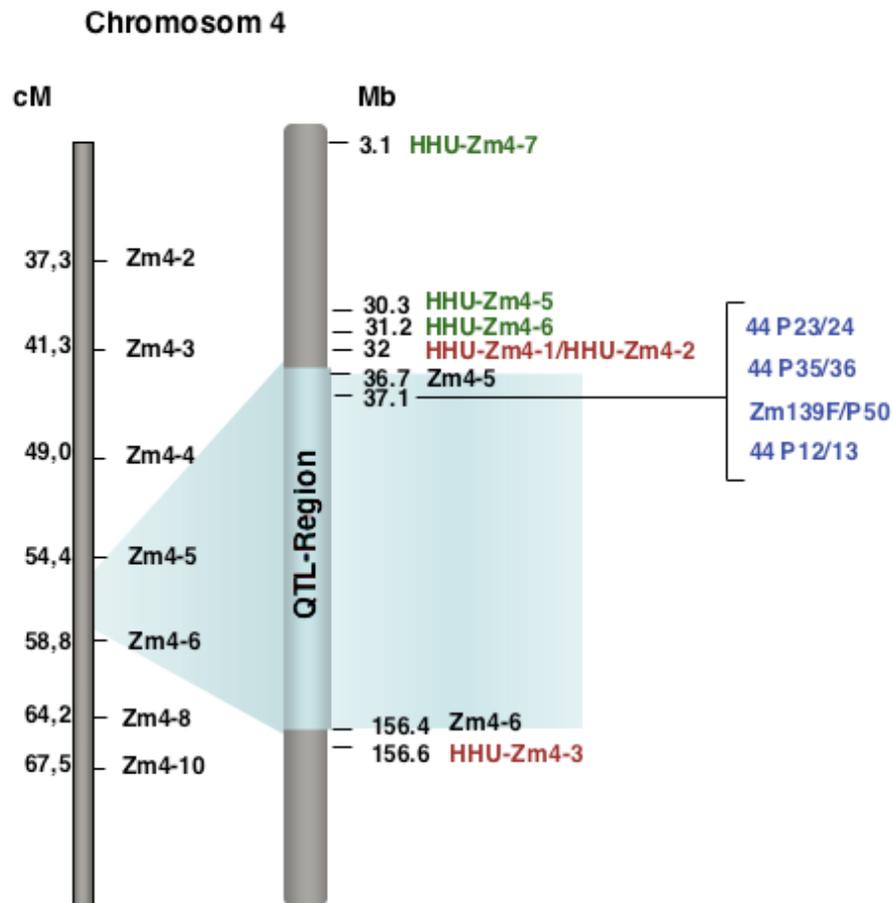


Abbildung 3-16: Die Verteilung der neu entwickelten Marker auf dem Chromosom 4.

Links ist die genetische Karte des Chromosoms 4 dargestellt, rechts die physikalische. Drei neu entwickelte Marker (grün dargestellt) konnten auf dem Chromosom 4 außerhalb der QTL-Region kartiert werden. Die blau dargestellten Marker sind die für die Kartierung der QTL4-Region zur Verfügung gestellten Marker und kartieren unterhalb des Markers Zm4-5.

3.4. Feinkartierung des Blattchlorose-Locus und des Frischmasse-QTL in sub-nahe-isogenen Linien (subNIL)

Für die weitere Einengung des Frischmasse-QTL auf dem Chromosom 4 wurden aus den NI-Linien bei der KWS sub-nahe-isogene-Linien (sub-NILs) hergestellt. Für die Herstellung der sub-NILs sind NI-Linien zu kühesensitiven Elter-Linien (SL) rückgekreuzt worden und anschließend geselbstet, was zur Homozygotie der QTL-Region auf dem Chromosom 4 in einem kühesensitiven Hintergrund führte (siehe Abbildung 3-17). Dadurch wurden die DNA-Segmente der toleranten Elter-Linie in den sub-NILs weiter zerlegt. Dies ermöglichte, die QTL4-Region weiter einzuengen.

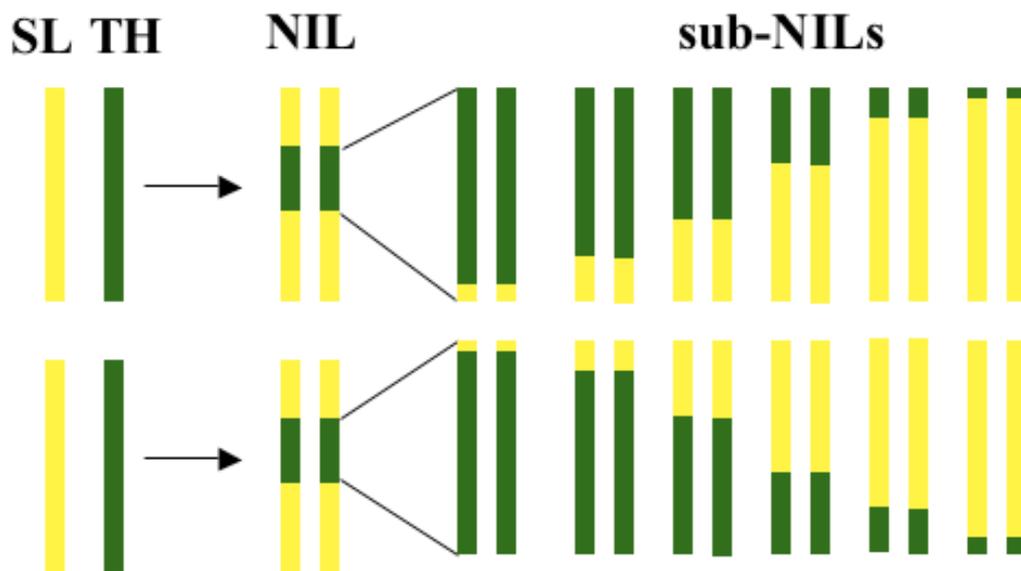


Abbildung 3-17: schematische Darstellung der Herstellung von sub-NILs.

Für die Herstellung der sub-NILs wurden zwei NI-Linien TH-N4-2X und TH-N4-3X genutzt. Diese Linien sollten mit vorhandenen Markern genotypisiert und unter Laborbedingungen phänotypisch analysiert werden. Die TH-N4-2 ist eine sensitive Linie, die ursprünglich als tolerante Linie angesehen wurde. Die TH-N4-3 ist eine tolerante Linie. Es wurden 31 sub-NILs hergestellt, 16 Linien wurden aus TH-N4-2X und 15 Linien aus TH-N4-3 hergestellt (siehe Abbildung 3-18, Frischmasse-Leistungen der Linien sind in der Tabelle 3-3 dargestellt).

LINIE	FRISCHMASSE (g/Pflanze 2009)	FRISCHMASSE (g/Pflanze 2006)	FRISCHMASSE (g/Pflanze 2006)
SL	46,96	81,66	105,5
TH	85,54	100,01	133,9
NI-Linien			
TH-N4-2X		88,8	
TH-N4-3X	64,39		
subNI-Linien aus TH-N4-2X			
TH-N4-27	45,71		
TH-N4-41	53,17		
TH-N4-42	49,76		
TH-N4-43	49,53		
TH-N4-23HX			115,59
TH-N4-28	48,35		
TH-N4-20X	64,76		
TH-N4-32	62,02		
TH-N4-33	62,37		
TH-N4-24X			121,62
TH-N4-21X			116,67
TH-N4-22HX	52,05		
TH-N4-37	51,34		
TH-N4-39	51,29		
TH-N4-19X			114,84
TH-N4-18X	53,97		
sub NI-Linien aus TH-N4-3X			
TH-N4-56X	58,84		
TH-N4-52X	60,84		
TH-N4-83	69,04		
TH-N4-84	62,25		
TH-N4-50X	43,47		
TH-N4-99	38,52		
TH-N4-98	43,67		
TH-N4-77	41,74		
TH-N4-90	43,70		
TH-N4-73X	49,83		
TH-N4-94	39,57		
TH-N4-95	45,26		
TH-N4-92	42,36		
TH-N4-91	49,12		
TH-N4-85	49,01		

Tabelle 3-3: Frischmasseleistung der Linien SL, TH, NIL4-2X, NIL4-3X und sub-NILs.

Für die Kartierung des Blattchlorose-Locus wurden alle sub-NILs- und NI-Linien mit den vorhandenen Markern genotypisiert und in der Klimakammer phänotypisiert (siehe Abbildung 3-18). Die Analyse zeigte, dass der Frischmasseertrag der meisten subNILs mit dem Blattchlorose korrelierte. Eine Ausnahme stellte hier die sub-NIL TH-N4-20X dar, die trotz eines hohen Frischmasseertrages, den chlorotischen Phänotyp nach der Kältebehandlung zeigte. Dieses Ergebnis zeigt, dass die beiden Merkmale der Frischmasseertrag und die

(TH, grün) stammt und der Marker Zm4-6 vom kühesensitiven Elter (SL), zeigen keine Blattchlorose. Die Linien, bei denen diese Region von der kühesensitiven Elter-Linie (SL) stammt, zeigen den chlorotischen Phänotyp (siehe Abbildung 3-18). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Blattchlorose-Locus zwischen den Markern Zm4-5 und 44P12/13 liegen könnte. Da die Region von Zm4-5 und Zm4-6 ca. 122Mb beträgt und die Markerverteilung der Region nicht bekannt ist, wäre es auch möglich, dass der QTL für den Blattchlorose-Locus zwischen 44P12/13 und Zm4-6 liegen könnte.

Zwei sub-NILs TH-N4-20X und TH-N4-28 unterscheiden sich in der Frischmasseleistung: TH-N4-20X weist einen höheren Frischmasseertrag (Jahr 2009) im Vergleich zu TH-N4-28 auf, obwohl die Markerverteilung bei beiden Linien in der QTL4-Region ähnlich ist (siehe Abbildung 3-18). Das Ergebnis der Genotypisierungen der NI- und sub-NILs mit den neu entwickelten Markern lässt vermuten, dass der Frischmasse-QTL auf dem Chromosom 4 zwischen den Markern Zm4-5 und 44P23/24 lokalisiert werden könnte. Die Tatsache, dass die Region zwischen den Markern Zm4-5 und Zm4-6 ca. 122Mb groß ist, schließt jedoch die Möglichkeit nicht aus, dass der Frischmasse-QTL auch zwischen den Markern Zm4-5 und Zm4-6 liegen könnte.

In den drei sub-NILs TH-N4-32, TH-N4-33, TH-N4-24X, die aus der TH-N4-2X Linie entwickelt wurden, stammt diese Region aus der kühetoleranten Elter-Linie (TH). Da diese sub-NILs durch die Rückkreuzung der TH-N4-2X mit der kühesensitiven Elter-Linie (SL) erstellt werden, sollte eigentlich ausgeschlossen sein, dass die drei Linien die Region zwischen den Markern 44P23/24 und 44P12/13 aus der TH-Linie aufwiesen. Die Erklärung dafür wäre der heterozygote Zustand der TH-N4-2X Linie, woraus die sub-NILs erstellt worden sind. Die DNA-Analysen der Pflanzen aus verschiedenen Jahren zeigten tatsächlich, dass manche Pflanzen der TH-N4-2X Linie einen heterozygoten Zustand in dieser Region aufwiesen.

3.5 Feinkartierung des Blattchlorose-Locus auf dem Chromosom 4 mittels aufspaltender F₂-Population

Für die weitere Kartierung des Blattchlorose-Locus auf dem Chromosom 4 war wichtig die Vererbungsmodus der Blattchlorose zu bestimmen. Um dies zu untersuchen, wurden zehn NI- und sub-NILs ausgewählt (siehe Abbildung 3-19). Die meisten der ausgewählten Linien

zeigen Rekombination in der QTL4-Region (auf der Abbildung 3-19 mit hell blauem Hintergrund gekennzeichnet).

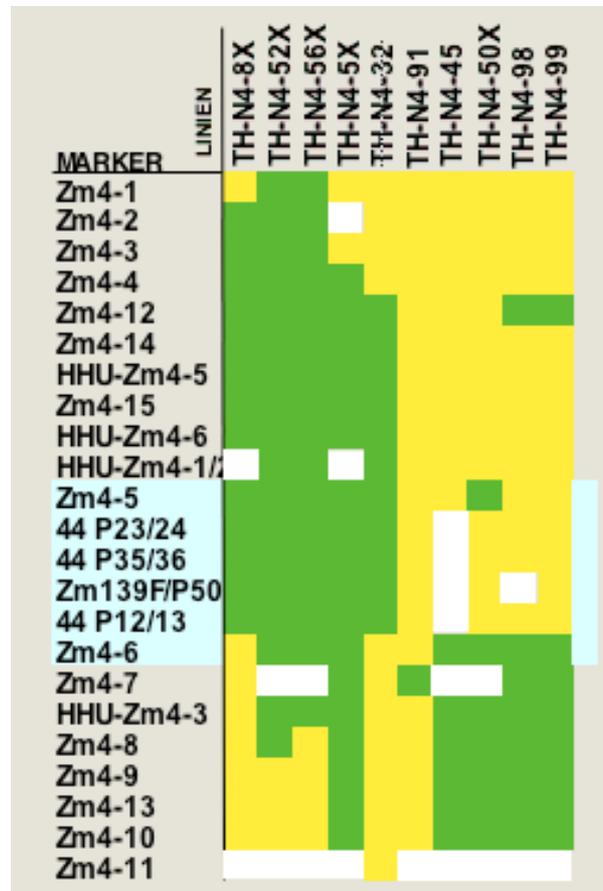


Abbildung 3-19: Für den „heterozygoten Test“ ausgewählten Linien.

Die ersten fünf Linien (TH-N4-8X, TH-N4-52X, TH-N4-56X, TH-N4-5X und TH-N4-32) stellen kühetoleranten Linien dar, die im homozygoten Zustand keine Blattchlorose nach der Kältebehandlung aufweisen. Die letzten fünf Linien (TH-N4-91, TH-N4-45, TH-N4-50X, TH-N4-98 und TH-N4-99) sind kühesensitive Linien, die in homozygoten Zustand den chlorotischen Phänotyp aufweisen (siehe Tabelle 3-4). Diese ausgesuchten Linien wurden bei der KWS mit der kühesensitiven Elter-Linie SL rückgekreuzt. Dies brachte den Frischmasse-QTL4 in der F1-Population in heterozygoten Zustand. Die Pflanzen der F1-Population wurden unter Laborbedingungen angezogen und nach der Kältebehandlung phänotypisiert. Alle Linien, mit oder ohne Blattchlorose im homozygoten Zustand, wiesen in heterozygoten Zustand die Blattchlorose auf (siehe Tabelle 3-4 und Abbildung 3-20). Daraus lässt sich schließen, dass es sich bei der Blattchlorose um ein dominantes Merkmal handelt.

Linien	N4-8	N4-52	N4-56	N4-5	N4-32	N4-91	N4-45	N4-50	N4-98	N4-99
homozygot	nein	nein	nein	nein	nein	ja	ja	ja	ja	ja
heterozygot	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja

Tabelle 3-4: „Heterozygoter Test“ der NI-Linien

Zehn NI-Linien wurden für den „heterozygoten Test“ ausgesucht. Die Fünf Linien N4-8, N4-52, N4-56, N4-5 und N4-32 zeigten im homozygoten Zustand keinen chlorotischen Phänotyp nach der Kältebehandlung (mit „nein,“ gekennzeichnet), die fünf Linien N4-91, N4-45, N4-50, N4-98 und N4-99 zeigten den chlorotischen Phänotyp nach der Kältebehandlung (mit „ja“ gekennzeichnet). Alle zehn Linien weisen im heterozygoten Zustand nach dem Kältetestress den Blattchlorose-Phänotyp auf.



Abbildung 3-20: Die Blattchlorose ist ein dominantes Merkmal.

Insgesamt wurde 10 Linien getestet. Exemplarisch wird das Ergebnis für die Linie TH-N4-32 gezeigt. Auf der Abbildung sind die fünften Blätter der Linien SL (links), TH-N4-32 im heterozygoten Zustand (zweite von links), TH-N4-32 im homozygoten Zustand (dritte von links) und TH (rechts) jeweils nach der Kältebehandlung dargestellt. Die Linie TH-N4-32, die im homozygoten Zustand keinen chlorotischen Phänotyp zeigt, weist im heterozygoten Zustand Blattchlorose auf.

Für die weitere Feinkartierung des Blattchlorose-Locus konnten Kartierungspopulationen genutzt werden. Für die Herstellung der F2-Population wurden die NI-Linien TH-N4-8X und TH-N4-32 ausgesucht. Dies sind kühetolerante Linien und weisen keine Blattchlorose auf. Die Linie TH-N4-32 stellt eine sub-NIL dar, die aus der TH-N4-2X hergestellt wurde und hat eine kleinere QTL4-Region als die Linie TH-N4-8X. Diese Linien wurden bei der KWS mit der kühesensitiven Elter-Linie (SL) rückgekreuzt und die Pflanzen der F2 Population mit den vorhandenen Markern genotypisiert. Die F2-Pflanzen waren im Feld auf Frischmasse noch nicht getestet worden, deshalb konnte durch die Analyse der Linien nur der Blattchlorose-Locus analysiert werden. Da die Blattchlorose ein dominantes Merkmal ist, dies sollte für die Feinkartierung des Blattchlorose-Locus genutzt werden.

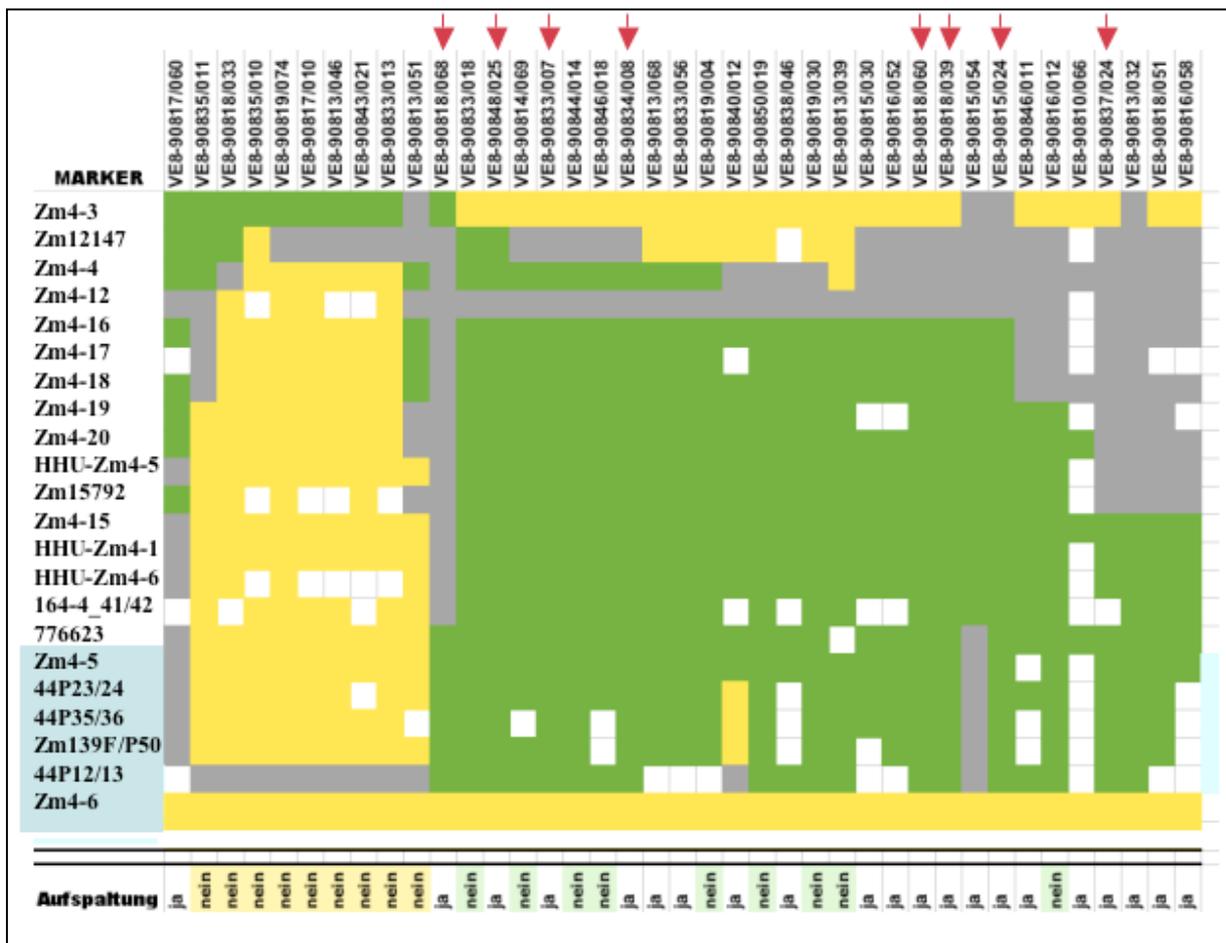
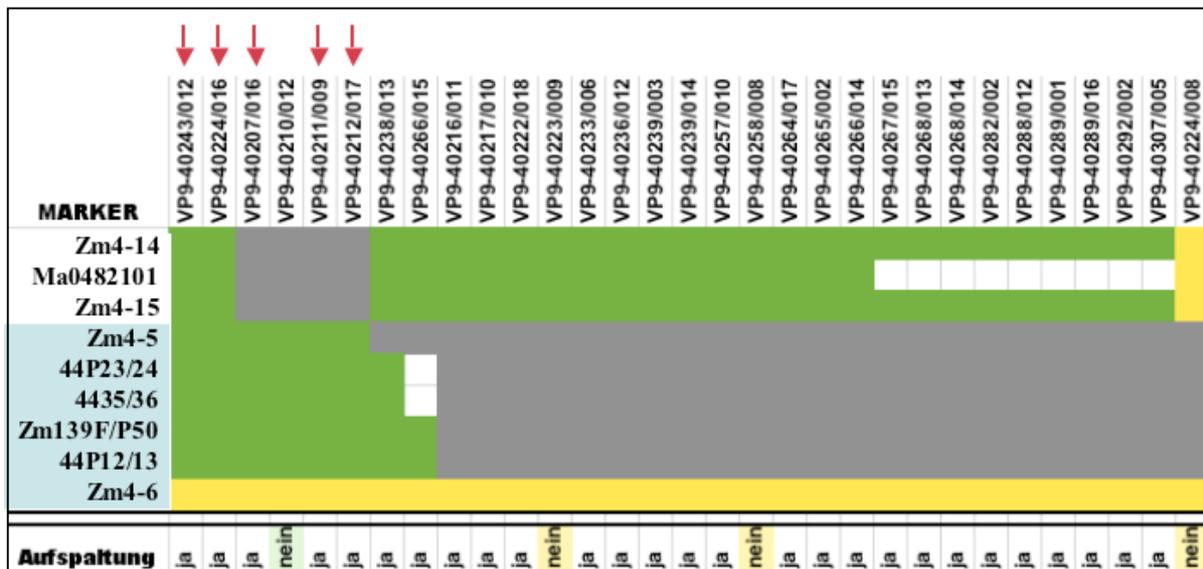
Aus der Kreuzung SLXTH-N4-32 wurden 217 rekombinante Linien ausgesucht und mit den Markern Zm4-5, P23/24, P35/36, Zm139F/P50, 44P12/13 genotypisiert. Aus den Linien, die Rekombinationen in der QTL-Region zeigten, wurden 31 Linien zur Phänotypisierung ausgewählt (siehe Abbildung, 3-21 A). Aus der Kreuzung SLXTH-N4-8 wurden 254 rekombinante Linien mit den drei Markern Zm4-16, HHU-Zm4-5 und HHU-Zm4-1 genotypisiert. Für die Phänotypisierungen wurden 39 Linien ausgewählt und analysiert (siehe Abbildung 3-21, B). Es wurden jeweils pro Linie sechs bis acht Pflanzen phänotypisiert.

Wie auf der Abbildung 3-21 (A) zu sehen ist, zeigen 27 aus den 31 analysierten Linien aus der Kreuzung SLXTH-N4-32 eine Aufspaltung. In den fünf Linien VP9-40243/012, VP9-40224/016, VP9-40207/016, VP9-40211/009 und VP9-40212/017 (auf der Abbildung 3-21, A mit dem Pfeil gezeichnet) stammt die Region zwischen den Markern Zm4-5 und 44P12/13 aus der kühetoleranten Elter-Linie (TH) und ist in homozygotem Zustand. Die Blattchlorose in diesen Linien spaltet auf, die Pflanzen zeigen teilweise starken chlorotischen Phänotyp. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass der Blattchlorose-Locus nur unterhalb 44P12/13 und oberhalb Zm4-6 liegen könnte.

39 Linien der F2-Population der Kreuzung SLXTH-N4-8 wurden analysiert (Abbildung 3-21, B). Die Linien (VE8-90818/068, VE8-90848/025, VE8-90833/007, VE8-90834/008, VE8-90818/060, VE8-90818/039, VE8-90815/024, VE8-90837/024) mit der Region zwischen Zm4-5 und 44P12/13 aus dem TH-Elter in homozygoten Zustand zeigten auch in dieser Population Aufspaltung (auf der Abbildung 3-21, B mit dem Pfeil gezeichnet). Dieses Ergebnis bestätigt die Aussage, dass der Blattchlorose-Locus nur unterhalb 44P12/13 und oberhalb Zm4-6 liegen könnte. (Der Marker Zm4-6 wurde in dieser Population nicht kartiert,

auf der Abbildung 3-21 (B) ist der aufgrund des Genotyps der Elterlinie TH-N4-8X, wo der Zm4-6 aus der kühesensitiven Elter-Linie (SL) stammt, gelb markiert).

A



B

Abbildung 3-21: Genotypen und Phänotypen der analysierten F2-Population der Kreuzungen SLXN4-32X (A) und SLXN4-8X (B). Es wurden 31 Linien bzw. 39 Linien der F2 Population der SLXN4-32X (A) und SLXN4-8X (B) phänotypisiert. Blattchlorose nach der Kältebehandlung der Linien die Aufspaltung zeigen sind mit „ja“ gekennzeichnet, die Linien, die keine Aufspaltung zeigen sind mit „nein“ gekennzeichnet, der gelbe Hintergrund weist darauf hin, dass die Pflanzen nur den chlorotischen Phänotyp aufweisen, der grüne Hintergrund zeigt, dass alle analysierte Pflanzen keinen Blattchlorose-Phänotyp aufweisen. (der Farbcode- siehe Legende Abbildung 3-7).

3.6 Vergleich der Proteinspiegel von sensitiven und toleranten Linien

Das Wachstum der Maispflanzen kann unter kühlen Bedingungen Störungen in der Thylakoidentwicklung und Proteinmetabolismus in der Thylakoidmembran verursachen. Aus diesem Grund wurde nach Unterschieden zwischen den kühesensitiven- und kühetoleranten Linien in Chloroplasten auf Proteinebene untersucht. Für die Proteinanalyse wurden neben Elter-Linien SL und TH jeweils eine kühesensitive TH-N4-2X- und eine kühetolerante TH-N4-3X-Linie untersucht. Die Linien TH-N4-2X und TH-N4-3X unterscheiden sich in der Blattchlorose nach der Kältebehandlung sowie im Frischmasseeertrag (siehe Abbildung 3-22).

Die vierten und fünften Blätter der kühesensitiven Linien zeigen die Blattchlorose nach der Kältebehandlung. Einerseits wurden die chlorotischen und nicht chlorotischen Blattregionen der fünften Blätter und andererseits komplette Blattspreiten der vierten Blätter vor, während und nach der Kältebehandlung untersucht.

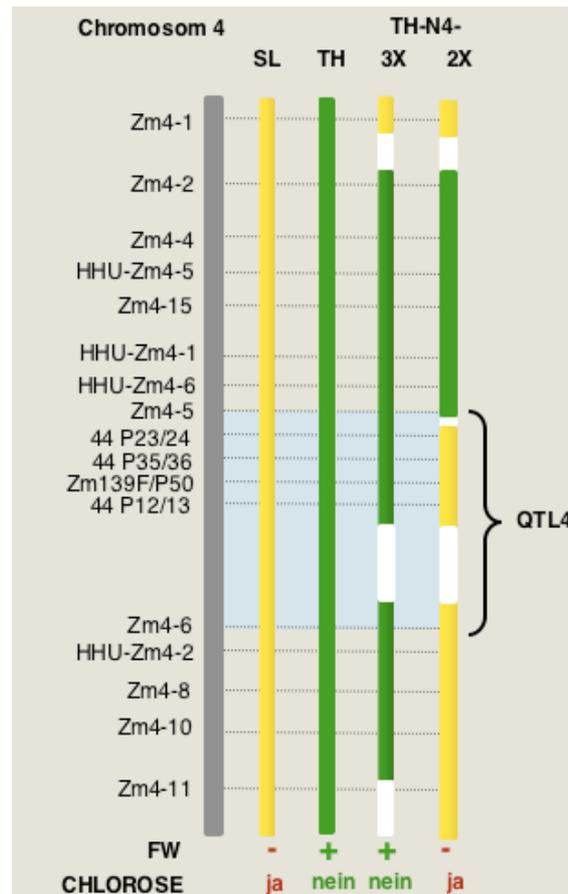


Abbildung 3-22: für die Proteinanalyse ausgewählte Linien. Die für die Proteinanalyse ausgewählten NI-Linene TH-N4-2X und TH-N4-3X unterscheiden sich in Frischmasseertrag und Blattchlorose-Phänotyp. Unter der Linien sind die Frischmasse-Leistung („-“, niedrige-, „+“-hohe Frischmasse) und die Blattchlorose-Phänotyp hingewiesen. (der Farbcode- siehe Legende Abbildung 3-7).

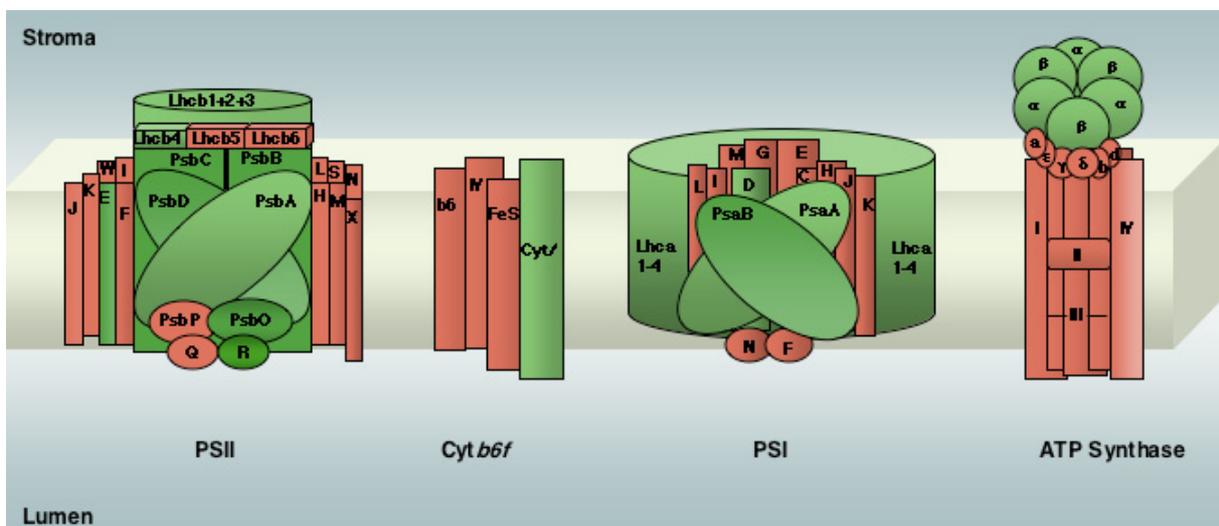


Abbildung 3-23: Schematische Darstellung der Tylakoidmembran-Komplexe PSII, Cytochrom *b6f*, PSI und ATP Synthase und der analysierten Proteine des Thylakoidmembran (grün dargestellt).

Es wurde nach Unterschieden in den Photosynthese-Proteinen der chlorotischen und nicht chlorotischen Regionen gesucht (Abbildung 3-23). Dafür wurden jeweils 4cm chlorotische bzw. nicht chlorotische Blattregionen aus den fünften Blättern der Linien SL, TH-N4-2X bzw. TH-N4-3X, TH nach einer Woche Erholung ausgeschnitten und Gesamtproteine isoliert.

Die Proteine wurden einerseits durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie-Blau gefärbt und andererseits durch Immunoblotanalyse untersucht. (siehe Abbildung 3-24 und 3-25).

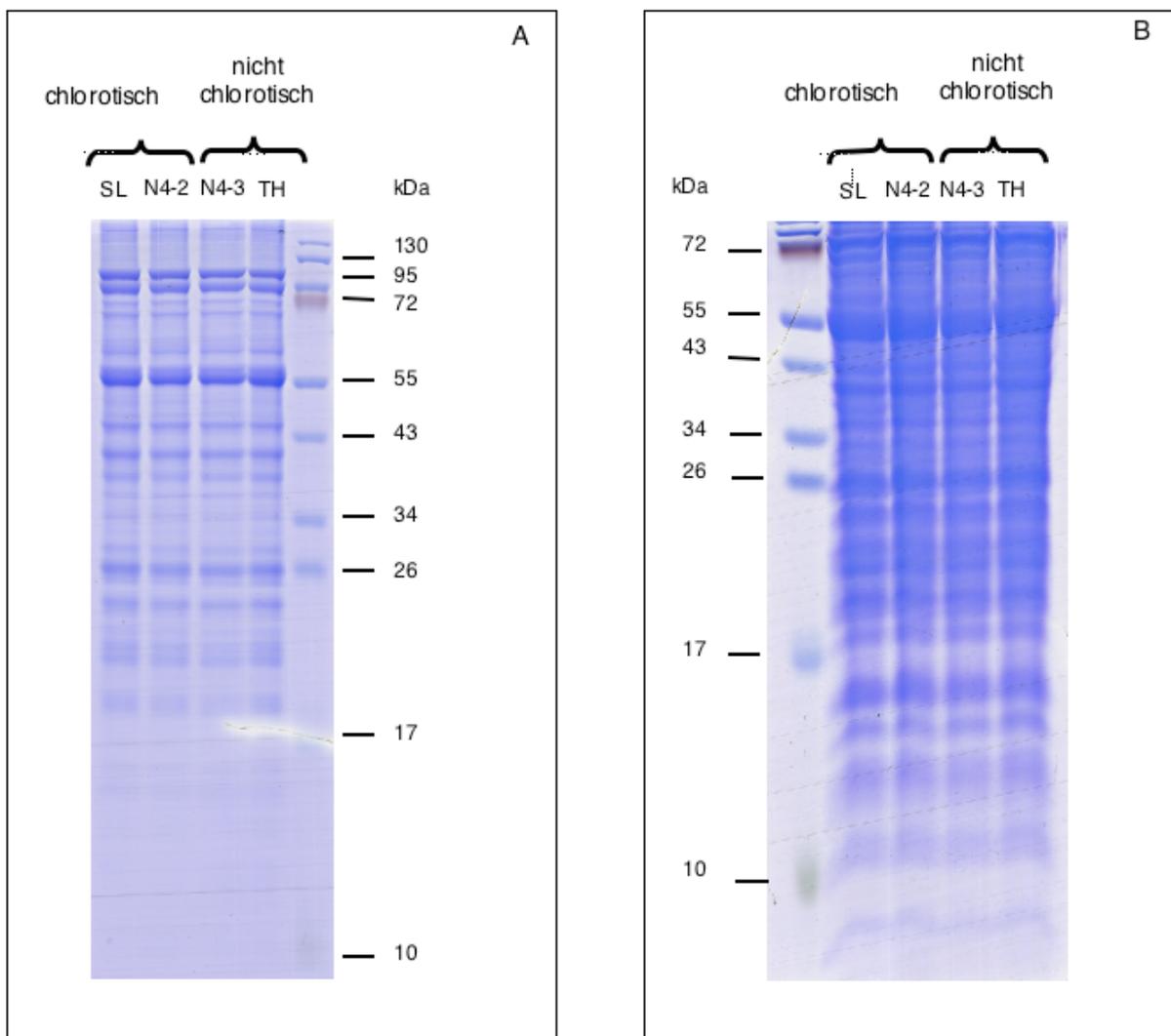


Abbildung 3-24: Coomassie-Blau-Färbung der Gesamtproteine aus chlorotischen und nicht chlorotischen Regionen der 5. Blätter.

Jeweils 20µg Gesamtproteine der Linien SL, TH-N4-2X, TH-N4-3X und TH, die nach einer Woche Erholung isoliert worden waren, wurden aufgetrennt und anschließend mit Coomassie-Blau gefärbt. Die Auftrennung folgte durch 12,5% SDS-PAGE für die größeren Proteine (A) und durch 18% SDS-PAGE für die kleinen Proteine (B). Die molekulare Masse der Markerproteine ist rechts (A) und links (B) in Kilodalton dargestellt.

Durch die Coomassie-Blau-Färbung war es möglich, sich einen Überblick über das Gesamtprotein-Muster zu verschaffen. Durch die 12,5% SDS-PAGE konnten die Proteine mit größerer Masse, wie PEPC (100-110kDa), RbcL (56kDa), ATP Synthase (α , β Untereinheiten 57kDa), die Kernproteine des PSII-Komplexes (D1-32kDa, D2-34kDa), die Kernproteine des PSI-Komplexes (PsaA-83kDa, PsaB-82kDa) und anderen analysiert werden. Durch 18% SDS-PAGE war es möglich, die kleineren Proteine wie 10kDa-Protein, Cyt b559(a, 9kDa), RbcS (19kDa) zu analysiert. Wie auf der Abbildung 3-21 zu sehen ist, konnten durch die SDS-PAGE keine Unterschiede zwischen den chlorotischen und nicht chlorotischen Blattregionen detektiert werden.

Für die Proteinanalyse wurde eine Immunoblotanalyse durchgeführt. Analysiert wurden die Membranproteine der PSII-, PSI-, Cytochrom *b6f*-Komplexe, ATP-Synthase, sowie lösliche Proteine wie Phosphoenolpyruvatcarboxylase (PEPC) als C4-Marker, große und kleine Untereinheiten Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase (RbcL und RbcS) (siehe Abbildung 3-25). Wie die Abbildung 3-25 zeigt, weisen die analysierten Proteine keine Unterschiede zwischen den chlorotischen und nicht chlorotischen Blattregionen auf.

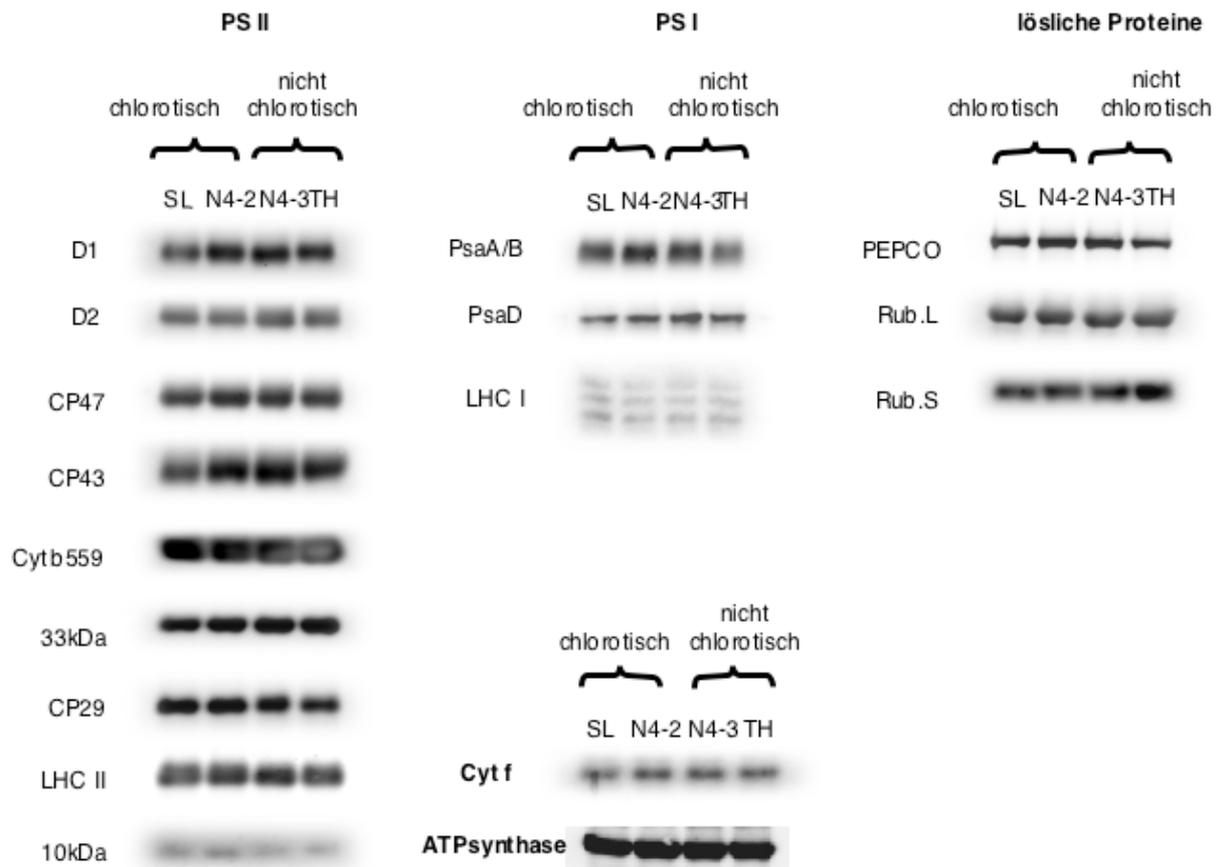


Abbildung 3-25: Analyse der Proteine der Thylakoidmembran und der löslichen Proteine.

Es wurden die chlorotischen und nicht chlorotischen Blattregionen der kühesensitiven Linien SL und N4-2 und der kühetoleranten Linien N4-3 und TH untersucht. Zur Analyse der Komplexe PSII (links), PSI, Cytochrom*b6f*, ATP Synthase (mitte) und der löslichen Proteine (PEPC und RbcL und RbcS) wurden jeweils 20mg Gesamtproteine aufgetrennt, geblottet und mit den Antikörpern inkubiert. Die Immunoblotanalyse wurde mit dem Material zwei biologisch unabhängiger Anzuchten durchgeführt und jeweils zweimal technisch wiederholt.

Es konnten weder durch SDS-PAGE Auftrennung (Abbildung 3-24) noch durch Immunologischer Nachweis (Abbildung 3-25) signifikante Unterschiede der Proteinspiegel zwischen den chlorotischen und nicht chlorotischen Blattregionen detektiert werden.

Es stellte sich die Frage, ob die untersuchten Proteine vielleicht vor, während und nach dem Kältestress in den kühesensitiven und den kühetoleranten Linien Unterschiede aufweisen. Deshalb wurde für diesen Versuch ebenfalls zwei kühesensitive (SL und TH-N4-2X) und zwei kühetolerante Linien (TH-N4-3X und TH) genutzt. Die kompletten Blattspreiten der vierten Blätter wurden auf Proteinebene analysiert. Die Blätter wurden vor der Kältebehandlung, nach einem Tag Kälte, nach sieben Tagen Kälte und nach einem Tag Erholung geerntet.

Die Proteinanalyse erfolgte durch SDS-PAGE (siehe Abbildung 3-26) und durch Immunoblotanalyse (siehe Abbildung 3-27). Für die Gel-Analyse wurden die Gesamtproteine der Linien SL, TH-N4-2X, TH-N4-3X und TH jeweils vor der Kälte (0h), während der Kälte (1d und 7d) und ein Tag nach der Kälte (7+1d) aufgetrennt.

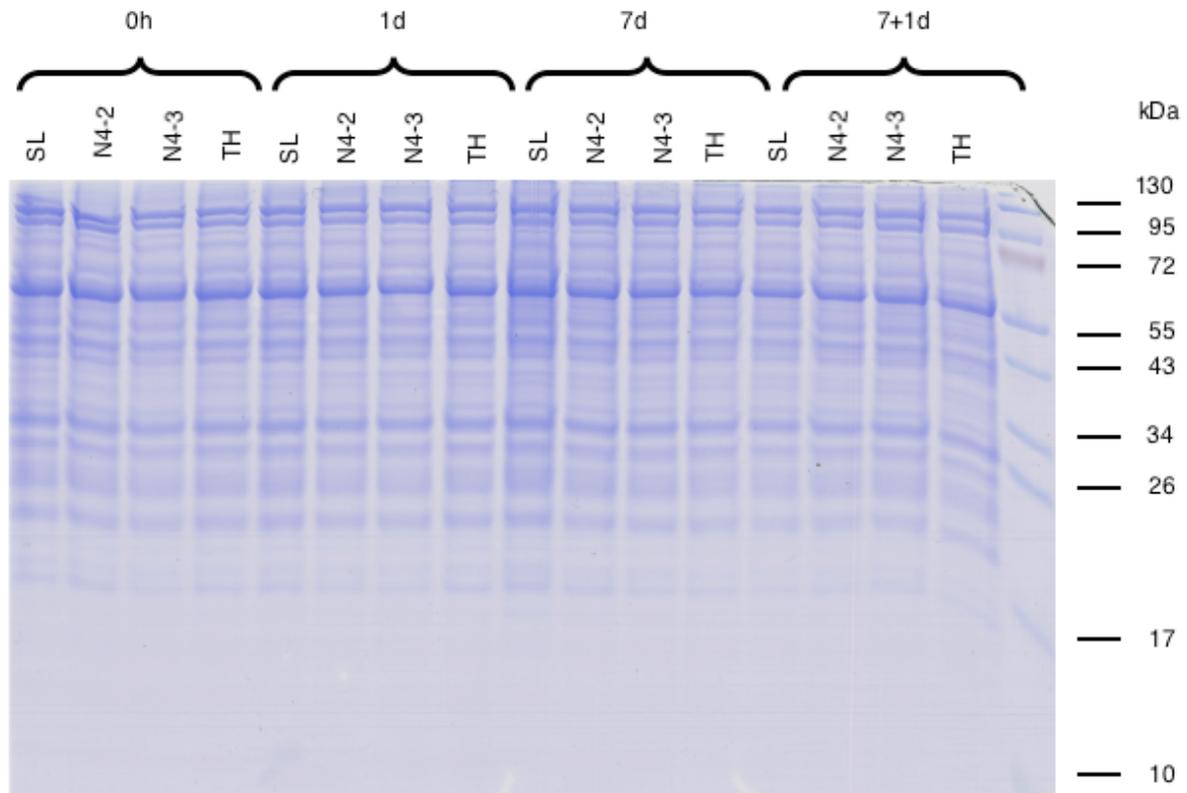


Abbildung 3-26: Analyse der Gesamtproteine aus den 4. Blättern

Zur Analyse der Proteinmuster der 4. Blätter der kühesensitiven (SL und N4-2) und kühetoleranten (N4-3 und TH) Linien vor der Kälte (0h), während der Kälte (1d und 7d) und nach einem Tag Erholung (7+1d) wurden jeweils 20µg Proteine aufgetrennt (SDS-PAGE, 12,5%) und anschließend mit Coomassie-Blau gefärbt.

Wie die Abbildung 3-26 zeigt, waren keine Unterschiede weder zwischen den kühesensitiven und kühetoleranten Linien noch vor, während und nach der Kältebehandlung zu detektieren. Durch die Immunoblotanalyse wurden die Membranproteine der PSII-Komplexes - D1, D2, CP43, CP47, 33kDa, CP29, LHCII, 10kDa, PSI-Komplexes - PsaD, a und b Untereinheiten der ATP Synthase und die lösliche Proteine, wie PEPC und RbcS analysiert (siehe Tabelle 3-5). Die Analyse wurde mit den zwei biologischen Replikaten jeweils mit zwei Wiederholungen durchgeführt. Es konnte auch nach der Western Blot

Analyse keine signifikanten Unterschiede zwischen den Linien festgestellt werden (siehe Abbildung 3-27).

Photosystem II	D1, D2, CP43, CP47, 33kDa, CP29, LHCII, 10kDa
Photosystem I	PsaD
ATP Synthase	α , β Untereinheiten
Lösliche Proteine	PEPC, RbcS

Tabelle 3-5: die analysierte Proteine in vierten Blättern vor, während und nach der Kältebehandlung.

Es wurden die Proteine der Thylakoidmembran Komplexe PSII, PSI, und ATP Synthase sowie die lösliche Proteine PEPC und RbcS analysiert.

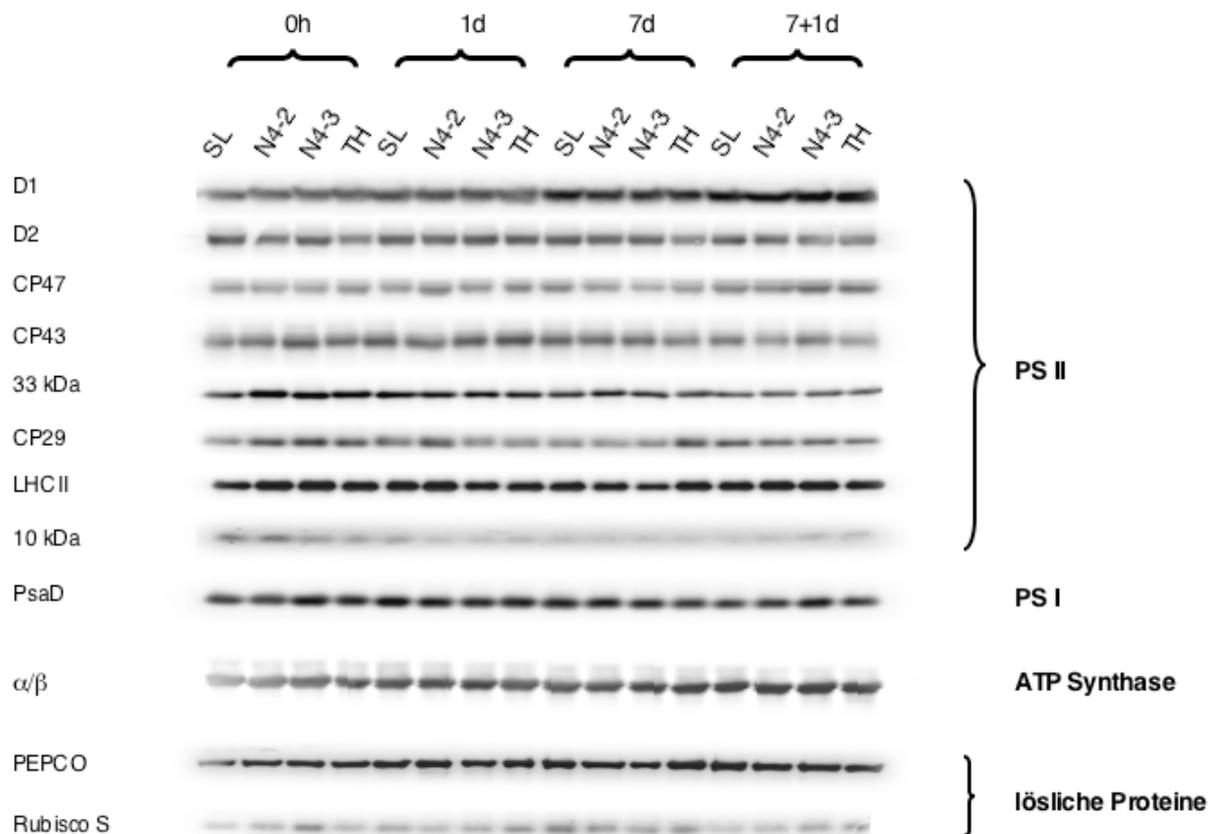


Abbildung 3-27: Immunologischer Nachweis der membran- und löslichen Proteine vor, während und nach der Kältebehandlung.

Zur Analyse der Proteine wurden kühesensitive Linien SL und N4-2 und kühetoleranten Linien TH und N4-3 genutzt. Die Proteine wurden aus den 4. Blätter isoliert, die vor der Kälte (0h), während der Kälte (1d, 7d) und nach einem Tag Erholung (7+1d) geerntet worden waren. Untersucht wurden die Komplexe PSII, PSI, ATP Synthase und der löslichen Proteine PEPC und RbcS. Es wurden jeweils 20µg Proteine aufgetrennt, geblottet und mit Antikörpern inkubiert. Die Immunoblotanalyse wurde mit dem Material zwei biologisch unabhängiger Anzuchten durchgeführt und jeweils zweimal technisch wiederholt

3.7. QTL4-vermittelte differenzielle Genexpression unter Kühlebedingungen

Um die Gene zu identifizieren, die bei der Ausbildung der Kältetoleranz beteiligt sind und auf den Kältestress mit der veränderten Expression reagieren, wurde eine suppressive subtraktive Hybridisierung (SSH) durchgeführt. Eine SSH ermöglicht die Amplifizierung und Identifizierung der differenziell exprimierten Gene.

Für eine SSH wurden die kühesensitive Elter-Linie SL und zwei NI-Linien, die kühetolerante TH-N4-3X und die kühesensitive TH-N4-2X, genutzt.

Es wurden zwei unabhängige SSH durchgeführt, einerseits mit den SL- und TH-N4-2X-Linien und andererseits mit den SL- und TH-N4-3X-Linien. Es wurden jeweils „vorwärts“ und „reverse“ Subtraktionen durchgeführt. Da die Region, in der die Blattchlorose entsteht, während des Kältestresses in die Blattscheide eingewickelt ist, wurden als Pflanzenmaterial die Blattscheiden aller Blätter bis zu Ligula des 3. Blattes genutzt. Bei der „vorwärts“ Subtraktion wurde aus der SL gewonnene cDNA als „Driver“ genutzt und wurde von der „Tester“-cDNA aus der NI-Linie abgezogen. Bei der „vorwärts“ Subtraktion sollten in Kälte stärker exprimierte Gene in den NI-Linien identifiziert werden. Bei der „reverse“ Subtraktion wurden die „Driver“ und „Tester“ cDNAs miteinander vertauscht, d.h. cDNA aus der NI-Linie wurde als „Driver“ genutzt und von der cDNA aus der SL abgezogen. Bei der „reverse“ Subtraktion sollten die in Kälte stärker exprimierte Gene in der SL-Linie identifiziert werden.

Das Ziel der ersten SSH war, die Gene zu identifizieren, die auf die Kälte mit schneller Expressions-Änderung reagierten. Aus diesem Grund wurde nach einem Tag Kälte geerntet. Für die SSH wurden die Elter-Linie SL und die kühesensitive NI-Linie TH-N4-2X, die ursprünglich als kühetolerante Linie galt, genutzt. Die SSH wurde mit der cDNA, die nach einem Tag Kälte aus den geernteten Blattscheiden hergestellt wurde, durchgeführt. Die „vorwärts“ Subtraktion ermöglicht, die Gene zu identifizieren, die nach einem Tag Kälte in

der TH-N4-2X-Linie stärker exprimiert sind als in der SL-Linie (siehe Tabelle 3-6; a). Andererseits werden durch „reverse“ Subtraktion die Gene angereichert, die nach einem Tag Kälte in der SL-Linie stärker exprimieren als in der TH-N4-2X (siehe Tabelle 3-6; b).

Die zweite SSH wurde mit der Elter-Linie SL und der kühletoleranten NI-Linie TH-N4-3X durchgeführt. Das Ziel der zweiten SSH war, die Gene zu detektieren, die vor dem Kältestress (0 h) und nach der Kältebehandlung (7+1 d) mit veränderter Expression reagierten. Dafür wurden die cDNAs aus den Blattscheiden der Pflanzen hergestellt, die vor der Kälte (0h) und nach einem Tag Erholung (7+1d) geerntet worden waren. Es wurde jeweils doppelte Subtraktion durchgeführt. Bei der ersten Subtraktion war die cDNA der TH-N4-3X-Linie vor der Kältebehandlung (0h) „Tester“, erster „Driver“ war die cDNA aus der TH-N4-3X-Linie nach einem Tag Erholung (7+1d), der zweite „Driver“ die cDNA der SL Linie vor der Kältebehandlung (0h). Mit dieser Subtraktion sollten die Gene angereichert werden, die in TH-N4-3X vor dem Kältestress stärker exprimiert waren als in der SL (siehe Tabelle 3-6; c). Bei der zweiten Subtraktion war der „Tester“ die cDNA der Linie TH-N4-3X nach einem Tag Erholung(7+1d), als erster „Driver“ diente die cDNA der TH-N4-3-Linie vor der Kältebehandlung (0h) und als zweiter „Driver“ die cDNA der SL nach einem Tag Erholung nach dem Kältestress (7+1d). Bei der Subtraktion sollten die Gene, die nach einem Tag Erholung in der TH-N4-3X-Linie stärker exprimiert sind als in SL, zum gleichen Zeitpunkt angereichert werden (siehe Tabelle 3-6; d).

SSH	Tester	Driver	Bücherei angereichert für
a. TH-N4-2 1d - SL 1d	TH-N4-2 1d	SL 1d	Gene, die nach einem Tag Kälte in TH-N4-2 stärker exprimiert werden als in SL
b. SL 1d – TH-N4-2 1d	SL 1d	TH-N4-2 1d	Gene, die nach einem Tag Kälte in TH-N4-2 schwächer exprimiert werden als in SL
c. (TH-N4-3 0h – TH-N4-3 7+1d) - SL 0h	TH-N4-3 0h	TH-N4-3 7+1d SL 0h	Gene, die vor der Kälte in TH-N4-3 stärker exprimiert werden als in SL
d. (TH-N4-3 7+1d – TH-N4-3 0h) - SL 7+1d	TH-N4-3 7+1d	TH-N4-3 0h SL 7+1d	Gene, die nach einem Tag Erholung in TH-N4-3 stärker exprimiert werden als in SL

Tabelle 3-6: die durchgeführten suppressive subtraktive Hybridization (SSH).

Die subtrahierte und durch PCR amplifizierte cDNA wurde in *E.coli* Zellen transformiert. Für jede Subtraktion wurden je 500 Klone isoliert und deren Insertion mittels PCR amplifiziert. Um zu überprüfen, ob die 2000 isolierten Klone tatsächlich differentiell exprimierte Gene repräsentieren, wurden alle Klone mittels Macroarray-Hybridisierung analysiert. Dazu wurden PCR-Produkte auf Nylonmembran transferiert und mit verschiedenen cDNAs aus den Blattscheiden der Linien SL, TH-N4-2X, TH-N4-3X und TH hybridisiert. Die Ernte der Blattscheiden folgte vor der Kältestress (0 h), während der Kälte (1 d und 7 d) und einen Tag nach der Erholung (7+1d). Die erhaltenen Hybridisierungssignale wurden mit Phosphoimager quantifiziert und analysiert. Dadurch konnten 288 der ausgewählten cDNAs als Produkte differentiell exprimierter Gene identifiziert werden. Die entsprechenden Klone wurden sequenziert und mittels BLAST-Datenbank analysiert. Nach der Sequenz-Analyse wurden 216 aus 288 Sequenzen, als „single copy“-Sequenzen, untersucht. Auf der Abbildung 3-28 sind die Ergebnisse der BLASTX-Analyse der 216 Sequenzen dargestellt. Die Sequenzen wurde mit den in Datenbank veröffentlichten *Zea maize*-Sequenzen verglichen und in 11 Gruppen nach deren Funktionalität geteilt.

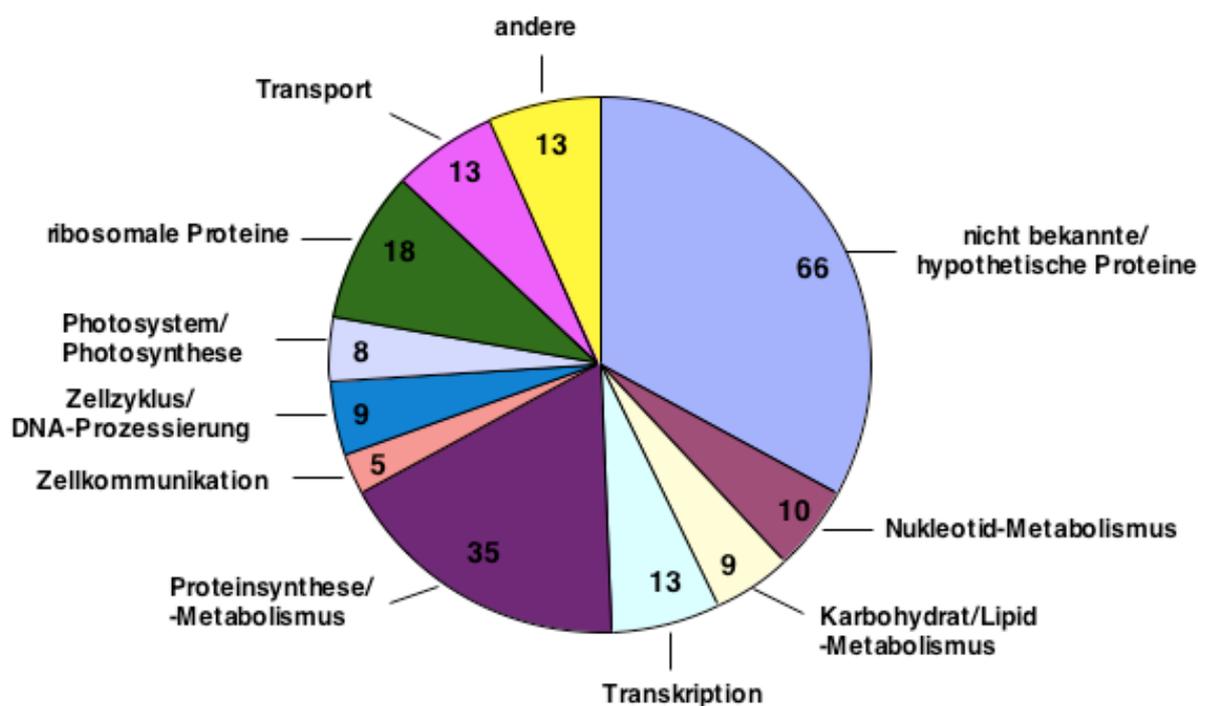


Abbildung 3-28: Klassifizierung der analysierten Sequenzen nach deren Protein-Homologie. Die 216 Sequenzen konnten in 11 Gruppen geteilt werden. Im Kreis ist die Anzahl der entsprechenden Sequenzen dargestellt.

Die Expressionsanalyse der ausgewählten 216 Klone sollte durch weitere Macroarray-Hybridisierung bestätigt werden. Dazu wurden sie auf Nylonmembran transferiert und mit oben erwähnten Sonden erneut hybridisiert. Die Macroarray-Analyse zeigte, dass nur 17 aus 288 Klonen als differentiell exprimiert waren. Die Expressionsunterschiede dieser Klone waren in beiden - Vorwärts- und Reverse-Hybridisierungen - gleich 2, oder größer als 2.

Zur Bestätigung der differentiellen Expression der ausgewählten Klone wurden weitere Hybridisierungen mit den Sonden der biologisch unabhängigen Replikaten durchgeführt. Durch diese Hybridisierungen konnte das veränderte Expressionsmuster nur in drei Kandidaten-Genen bestätigt werden. Die Expressionsunterschiede zwischen den Linien waren in allen drei Fällen gleich 2.

Das erste Fragment (Fragment 1) umfasst 576bp. Nach der BLASTX-Datenbankanalyse zeigte es eine 100%ige Homologie mit einem Protein, das im Chloroplasten kodiert sein soll (Gene id. 4055916, orf121-a-ct, *Zea mays*). Dieses Fragment kartiert auf verschiedenen Chromosomen mit 100%iger Homologie, unter anderem auch auf dem Chromosom 4. Dessen Transkriptmenge ist nach einem Tag Kälte in der Linie TH-N4-2X doppelt so hoch im Vergleich mit der Linie SL (siehe Abbildung 3-29, A und Abbildung 3-30, A). Die Transkriptmenge in SL und TH Linien war nach einem Tag Kältestress doppelt so niedrig wie vor der Kälte.

Das zweite Fragment (Fragment 2) umfasst 760pb und zeigte nach der BLASTX-Datenbankanalyse eine 100%ige Homologie mit einem hypothetischen Protein (ACG28338.1, *Zea mays*), das aufgrund des o.g. Computerprogrammes vorhergesagt ist und über dessen Expression noch keine experimentellen Beweise vorliegen. Nach der BAC-Analyse kartiert das Fragment 2, ebenso wie das Fragment 1, auf mehreren Chromosomen (100%ige Sequenzhomologie). Sie kartieren unter anderem beide auf dem Chromosom 4 und auf dem gleichen BAC. Die Gen-Transkripte des hypothetischen Proteins sind aber in der Linie TH-N4-3X im Vergleich mit der SL-Linie nach einem Tag Erholung doppelt so wenig (siehe Abbildung 3-29, B und Abbildung 3-30, B). Die Transkriptmenge war in kühesensitiven (SL) und kühetoleranten (TH) Linien, sowie in Fragment 1, nach einem Tag Kältestress doppelt so wenig wie davor.

Das dritte Fragment (Fragment 3) umfasst 714bp. Die BLASTX-Datenbankanalyse zeigte auf Protein-Ebene eine 98%ige Homologie mit dem Protein Elongations-Faktor 1-alpha (ACG34498.1, *Zea mays*). Das Gen kartiert auf dem Chromosom 8 und dessen Transkriptmenge war doppelt so hoch nach einem Tag Erholung in der Linie TH-N4-3X im Vergleich mit SL-Linie (siehe Abbildung 3-29, C und Abbildung 3-30, C). Das Gen zeigte

Kältere regulierung sowohl in kühesensitiver (SL) als auch in kühetoleranter (TH) Linie. Die Transkriptmenge war in beiden Linien doppelt so niedrig nach einem Tag Erholung wie vor und während der Kältebehandlung.

Das BAC, auf dem die Fragmente 1 und 2 kartieren (32,4Mb; nach Angaben www.maizesequence.org) liegt oberhalb des Markers Zm4-5 (36,7Mb) und daher auch oberhalb der QTL4-Region. Die Sequenzanalyse dieser Fragmente zeigte, dass die identischen Gen-Sequenzen auch im Chloroplasten- und Mitochondrien-Genom vorkommen. Mittels SSH konnten keine Gene identifiziert werden, die in der QTL4-Region lokalisiert und für die Ausbildung der Kühletoleranz verantwortlich waren.

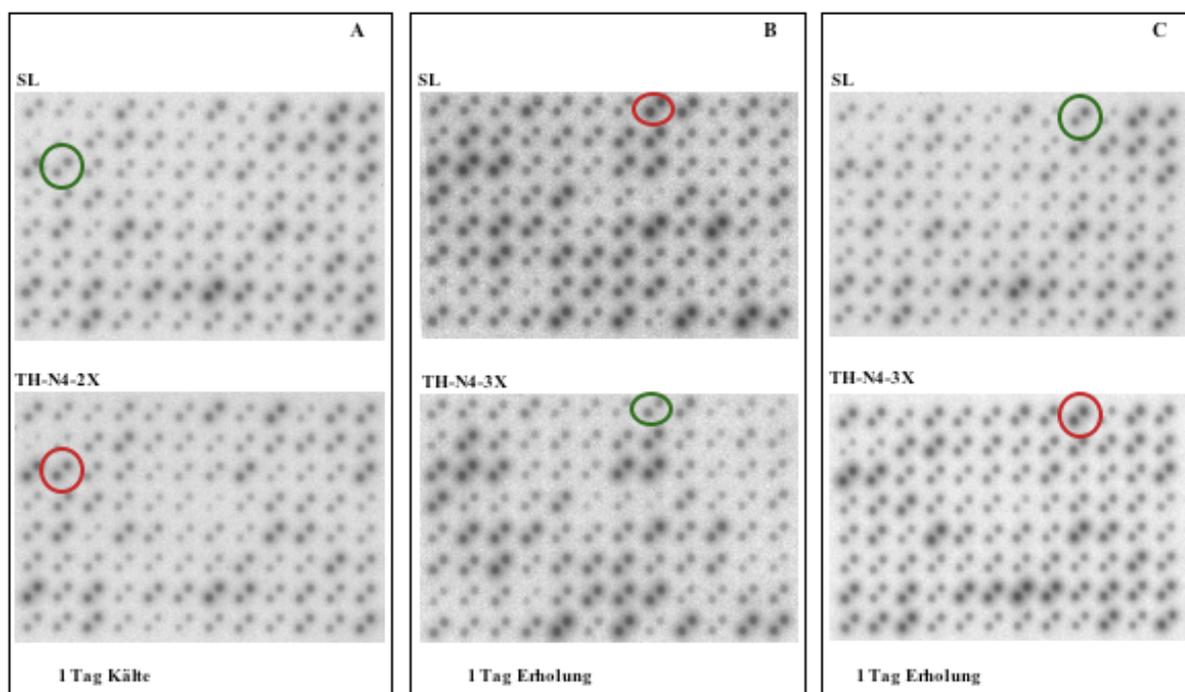


Abbildung 3-29: Die Expressionsanalyse durch Macroarray-Hybridisierung. Die Insertionen der ausgewählten Klone wurden auf Nylonmembran transferiert und mit verschiedenen Sonden hybridisiert. Als Sonden wurden die cDNAs aus den Blattscheiden der Linien

A) SL (oben) und TH-N4-2X (unten) nach einem Tag Kältebehandlung,

B) SL (oben) und TH-N4-3X (unten) nach einem Tag Erholung und

C) SL (oben) und TH-N4-3X (unten) nach einem Tag Erholung,

genutzt. Signale, die einen höheren Transkriptspiegel anzeigen sind durch rote Kreise, Signale, die einen niedrigeren Transkriptspiegel anzeigen, sind durch grüne Kreise markiert. Die Hybridisierungen wurden zweimal mit zwei biologisch unabhängigen Replikate-Sonden wiederholt.

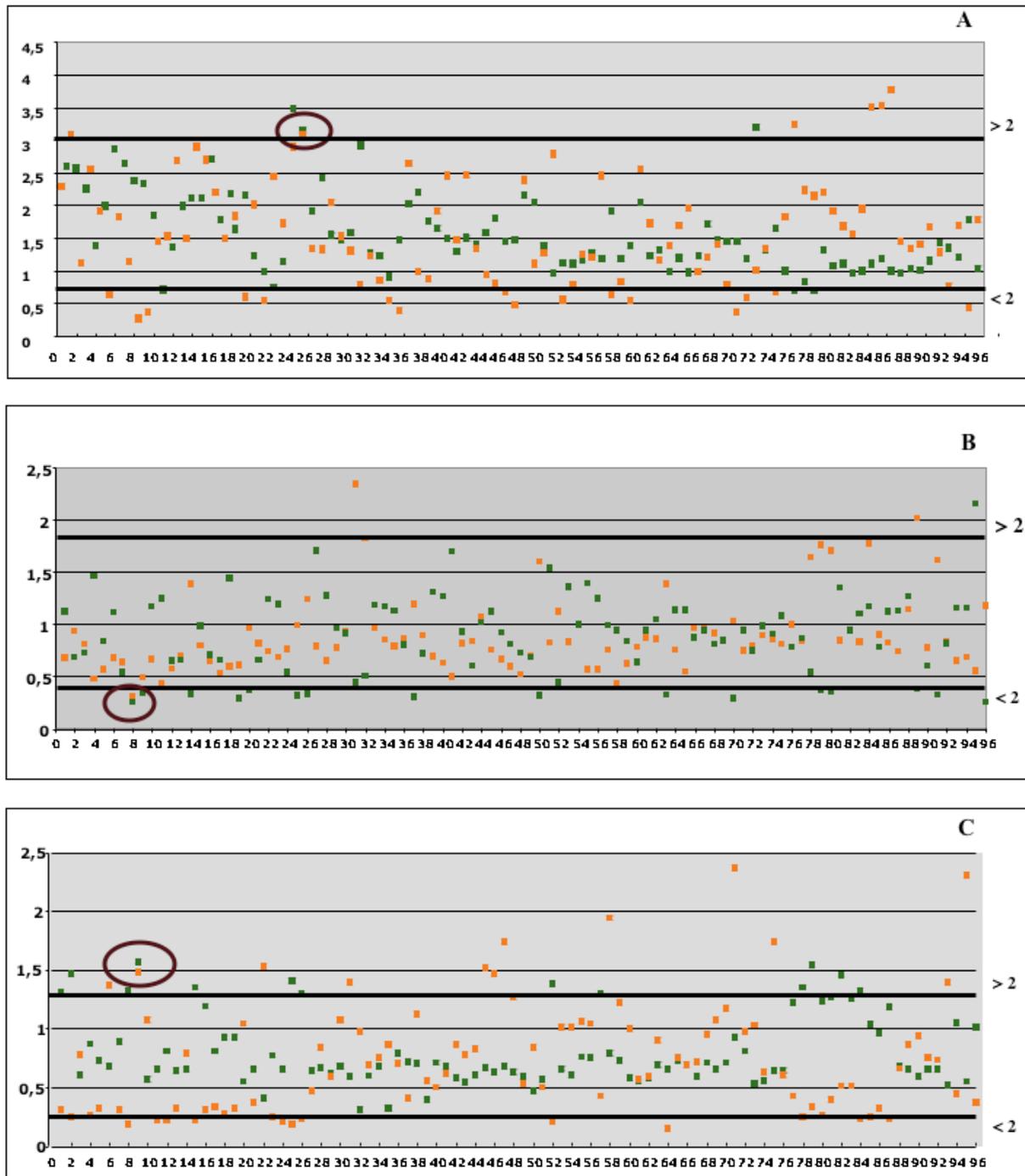


Abbildung 3-30: Auswertungen der Macroarray-Analysen.

Die Macroarray-Hybridisierungen wurden mit zwei biologisch unabhängigen Replikaten wiederholt. Die Expressions-Analyse der ersten Hybridisierung ist orange und die von der zweiten Hybridisierung grün dargestellt. Jeweils sind 3 x 96 Klone (auf der X-Axe dargestellt; A, B, C) analysiert worden. Das veränderte Expressionsmuster konnte nur in drei Kandidaten-Genen (mit Kreisen gekennzeichnet) bestätigt werden.

4. Diskussion

4.1. Kartierung des Frischmasse-QTL auf dem Chromosom 4

Ziel der vorliegenden Arbeit war, den QTL für Frischmasseertrag auf dem Chromosom 4 in Mais einzuengen und die genetischen Grundlagen der Kühletoleranz in Mais zu untersuchen. Die Kühlesensitivität der Mais-Pflanze ist einer der entscheidenden Faktoren, der den Maisanbau in Nordeuropa begrenzt. Kühle Temperaturen führen bei Mais zu einem gehemmten Jugendwachstum und zu Ertrags- und Qualitätsverlust. Aus diesem Grunde ist die Steigerung der Kühletoleranz in Mais für die Maiszüchtung in Nord- und Mitteleuropa von zentraler Bedeutung. Kühletolerante Mais-Linien zeigen - im Gegensatz zu kühesensitiven Linien - trotz der Kälte schnellere Jugendentwicklung und höheren Frischmasseertrag. Die Biomasse-Akkumulation in der Maispflanze ist also von den klimatischen Konditionen abhängig (Leipner *et al.*, 2008). Dies ist unter anderem das Resultat einer höheren photosynthetischen Effizienz und Kapazität unter suboptimalen Temperaturbedingungen (Leipner *et al.*, 1999). Eine QTL-Analyse ermöglicht, die genetischen Ursachen der Kühletoleranz zu identifizieren und Interaktionen zwischen physiologischen und morphologischen Merkmalen unter Kühlestress zu studieren.

Grundlage für die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zum Frischmasse-QTL auf dem Chromosom 4 waren die vorangegangenen Forschungsarbeiten, die bei der KWS, Einbeck, durchgeführt worden sind. Die Bestimmung der QTL für den Frischmasseertrag erfolgte durch die DH-Linien, die aus SL- und TH-Linien erstellt worden sind. Der auf dem Chromosom 4 detektierte Frischmasse-QTL erklärte 33,7% der phänotypischen Varianz und war zwischen den Markern Zm4-3 und Zm4-10 kartiert (Presterl *et al.* 2007). Der Frischmasse-QTL auf dem Chromosom 4 umfasste zu Beginn der Arbeit 155 Mb. Für die Einengung der QTL4-Region wurden neue Marker benötigt, deren Entwicklung eine große Herausforderung darstellte. Wie die Markerentwicklung zeigte, kartieren die meisten neu entwickelten Marker außerhalb der QTL4-Region. Die mangelnden Polymorphismen zwischen SL- und TH-Linien in dieser Region könnten ein Hinweis dafür sein, dass diese Linien dort identisch sind. Der Sequenz-Vergleich zwischen den Maislinien B73, SL und TH zeigt allerdings, dass die mangelnden Polymorphismen in der QTL4-Region nur zwischen den Linien SL und TH zu beobachten sind. Die Linie B73 zeigt durchaus Polymorphismus mit den SL- und TH-Linien. Aus 40 zwischen SL und TH monomorphen Sequenzen zeigen 32

Sequenzen Polymorphismen mit der B73. Der fehlende Polymorphismus in der QTL4-Region zwischen den SL und TH könnte durch die Centromerregion, die in dieser Region liegt, erklärt werden. Die Größe des Centromers variiert in verschiedenen Organismen und in verschiedenen Chromosomen. In *Arabidopsis thaliana* ist das Centromer zwischen 0,4 und 1,4 Mb groß. In Reis beträgt die Größe des Centromers 60 kb bis 1,4 Mb (Ma *et al.*, 2007). In Mais variiert die Größe des Centromers zwischen 0,3 und 2,8 Mb, auf dem Chromosom 4 beträgt sie ca. 0,5 Mb (Jin *et al.* 2004) und kartiert nach Angaben der Datenbank (www.maizesequence.org) zwischen den Contigs 169 und 170, bei 104 Mb. Die Größe des Centromers (0,5 Mb) ist im Vergleich zu der Größe der QTL4-Region (120 Mb) sehr klein. Es konnte daher ausgeschlossen werden, dass die fehlenden Polymorphismen zwischen den SL und TH in der QTL4-Region nur durch das Centromerregion bedingt war. Vielleicht gibt es aber durchaus Polymorphismen zwischen den Linien in der Region durch Nukleotidaustausch, die in 120 Mb jedoch schwer zu detektieren sind. Aufgrund der Gesamtanzahl der Gene und der Größe der physikalischen und genetischen Karte entspricht 1 cM in Mais ca. 1,24 Mb und 31 Genen (Salvi und Tuberosa, 2005). Die QTL4-Region entspricht dieser Berechnung allerdings nicht, in dieser Region entsprechen 120 Mb ca. 4 cM. Dieses Ergebnis weist auf eine niedrige Rekombinationsrate in der QTL4-Region hin. Für die Markerentwicklung der QTL4-Region wurden sowohl in der Datenbank www.maizesequence.org vorhandene BAC-Sequenzen der Maislinie B73 als auch durch AFLP-Analyse (durch die Firma *Keygene* durchgeführt) gewonnene Sequenzen analysiert. Durch die Analyse von ca. 20 Kb Sequenzen aus der Datenbank konnten nur die drei Marker HHU-Zm4-1, HHU-Zm4-2 und HHU-Zm4-3, die auf dem Chromosom 4 kartieren, entwickelt werden. Keiner von den neu entwickelten Markern kartiert in der QTL4-Region. Der Marker HHU-Zm4-4 konnte auf dem Chromosom 7 kartiert werden, obwohl die analysierte Sequenz nach der Angaben der Datenbank aus dem Chromosom 4 (QTL4-Region) stammt. Das deutet darauf hin, dass die Anordnung der BAC-Sequenzen in der Datenbank nicht der Anordnung der Sequenzen der analysierten Linien entspricht. Die Anordnung der BAC-Contigs auf dem Chromosom 4 wurde mit den zunehmenden Analysen und Sequenzierungen des Maisgenoms auf www.maizesequence.org geändert. Die Angaben über die Anordnung der BAC-Contigs in www.maizesequence.org - Version 2007 stimmt also nicht mit den Angaben in Version 2009/10 überein.

Durch die Markerentwicklung aufgrund der AFLP-Analyse konnten die drei Marker HHU-Zm4-5, HHU-Zm4-6 und HHU-Zm4-7 entwickelt werden. Alle drei Marker kartieren auf dem Chromosom 4, aber außerhalb der QTL4-Region. Sieben Marker konnten auf anderen Chromosomen kartiert werden. Vier Marker davon kartieren auf dem Chromosom 9, wovon

drei auf einem Abschnitt mit der Größe von 5,3 Mb liegen. Jeweils ein Marker konnte auf den Chromosomen 5, 6 und 1 kartiert werden. Die Markerverteilung auf anderen Chromosomen deutet darauf hin, dass entweder die analysierten Linien auch auf anderen Chromosomen als Chromosom 4 die Abschnitte aus der kühletoleranten TH-Linie enthalten, oder auch viele Primer, die für die Markerentwicklung genutzt worden waren, nicht optimal gelegt wurden und im Endeffekt Sequenzen aus anderen Chromosomen amplifiziert wurden. Während der Sequenzanalyse der Chromosomen 4 und 5 ist aufgefallen, dass manche Abschnitte in beiden Chromosomen zu finden sind, z.B. die Fragmente aus der QTL4-Region Contig 181 auch auf dem Chromosom 5. Diese Tatsache erschwerte die Markerentwicklung für die QTL4-Region noch zusätzlich. Eine Möglichkeit für die Markerentwicklung der QTL4-Region wäre die gezielte Sequenzierung des Bereiches in SL- und TH-Linien.

Die vier Marker 44P23/24, 44P35/36, Zm139F/P50 und 44P12/13, die für die Kartierung der QTL4-Region zur Verfügung gestellt wurden, kartieren auf einem BAC unterhalb des Markers Zm4-5. Der Abstand zwischen den Markern Zm4-5 und 44P23/24 beträgt ca. 400Kb. Die Genotypisierungen der NI- und subNILs zeigten, dass diese Marker in der NI-Linie TH-N4-2X von der kühesensitiven Elter-Linie (SL) stammen und sich in homozygoten Zustand befinden. In den drei subNI-Linien TH-N4-32, TH-N4-33 und TH-N4-24X stammt diese Region allerdings von der kühletoleranten Elter-Linie (TH). Da die oben genannten subNILs durch die Kreuzung der TH-N4-2X-Linie mit der kühesensitiven SL-Linie hergestellt worden sind, können eigentlich keine „zusätzlichen“ Chromosomabschnitte aus der TH-Linie in subNILs gelangen und somit wäre eine solche Markerverteilung ausgeschlossen. Eine Erklärung für die unterschiedliche Markerverteilung wäre, dass die Pflanzen der TH-N4-2X-Linie, woraus die subNILs hergestellt worden sind, in der Region unterhalb des Markers Zm4-5 im heterozygoten Zustand waren oder der Chromosom-Abschnitt dieser Region von der TH-Linie stammte und sich in homozygoten Zustand befand. Die Genotypisierungen der TH-N4-2X-Linie zeigten, dass tatsächlich die Pflanzen aus unterschiedlichen Chargen unterschiedliche Genotypen in dieser Region aufwiesen. Neben homozygoten (SL-) Pflanzen konnten auch heterozygote Pflanzen detektiert werden.

Nach den phänotypischen und genotypischen Analysen der NI-Linien, subNILs und aufspaltenden F₂-Populationen könnte die QTL-Region für den Frischmasseertrag zwischen den Markern Zm4-5 und Zm4-6 liegen. Die Größe der Region beträgt ca. 122Mb und macht fast die Hälfte des Chromosoms 4 (247Mb) aus. Da die Pflanzen der aufspaltenden F₂-Population noch nicht auf dem Feld getestet worden waren, konnte aufgrund der Phänotypisierungen und Genotypisierungen der Pflanzen der F₂-Population nur der

Blattchlorose-Locus analysiert werden. Die Ergebnisse der phänotypischen Analyse der 31 Linien der Kreuzung SLXTH-N4-32 zeigen, dass der Blattchlorose-Locus zwischen den Markern 44P12/13 und Zm4-6 liegen könnte. Durch die Analyse der Linien der Kreuzung SLXTH-N4-8X konnte die Aussage bestätigt werden.

4.2. Analyse der Blattchlorose und Frischmasseertrag in den kühesensitiven und kühetoleranten Linien

Um die phänotypischen Unterschiede zwischen SL und TH zu finden, wurden verschiedene Versuche durchgeführt. Da sich SL und TH auch ohne Kältebehandlung im Wachstum unterscheiden, wurde dieses Merkmal nicht weiter verfolgt. Es wurden unterschiedliche Temperaturen und verschiedene Zeitdauern der Kältebehandlung ausprobiert (K. Ernst). Es konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den SL- und TH-Linien nach der Kältebehandlung bei 6/8⁰C (tags/nachts) detektiert werden. Die kühesensitiven Linien wiesen nach dem Kältestress einen chlorotischen Phänotyp auf. Die in dieser Arbeit analysierte Blattchlorose ist ein Merkmal, in dem sich kühesensitive und kühetolerante Linien in einer frühen Entwicklungsphase voneinander unterscheiden. Die vierten und fünften Blätter der kühesensitiven Linien zeigten nach dem vierten Tag Erholung den chlorotischen Phänotyp. Chlorose entsteht durch Photooxidation des Chlorophylls in den Blättern, die sich noch in der Entwicklungsphase befinden. Blattchlorose ist ein gut bekanntes Kältestresssymptom von Mais. Ein QTL für Blattchlorose in Mais wurde von Presterl et al (2007) detektiert, der auf dem Chromosom 5 kartiert. Bei suboptimaler Temperatur (14-20⁰C) weisen nicht nur Mais- (Miedema *et al.*, 1987), sondern auch Reis- und andere Kulturpflanzen chlorotischen Phänotyp auf.

Maiskeimlinge haben bei niedriger Temperatur einen niedrigen Chlorophyll-Gehalt (Alberda 1969) und das Wachstum ist beeinträchtigt (Miedema *et al.*, 1987). Bei Temperaturen um 10-15⁰C wird das Chlorophyll durch Photooxidierung sehr schnell abgebaut (McWilliam und Naylor 1967), was durch hohe Lichtintensität noch verstärkt wird. Resistenz gegenüber der Chlorose ist ein wichtiger Faktor für einen gut funktionierenden Photosyntheseapparat und das Wachstum der Pflanze. Durch Zunahme der Chlorophyllmenge nehmen allerdings photosynthetische Effizienz und Trockenmasseertrag der Pflanze nicht zu (Greaves, 1996). Der Effekt der niedrigen Temperatur auf das Wachstum der Maispflanzen wird nicht immer durch Blattchlorose manifestiert (Schapendonk *et al.*, 1989).

Durch die Analyse der DH-Linien wurde eine genetische Kopplung zwischen Frischmasseertrag und Blattchlorose unter kühlen Bedingungen festgestellt. Die Analyse der NI-Linien, subNILs und aufspaltende F₂-Population zeigte auch meistens Übereinstimmung zwischen Frischmasseertrag und Blattchlorose. Eine Ausnahme machte die subNIL TH-N4-20X, die einen hohen Frischmasseertrag, aber nach der Kältebehandlung den chlorotischen Phänotyp zeigte. In dieser Linie wurden allerdings in verschiedenen Jahren unterschiedliche Frischmasseleistungen gemessen.

Das Wachstum der Pflanzen kann unter kühlen Bedingungen Störungen in der Thylakoidentwicklung und Proteinmetabolismus in der Thylakoidmembran verursachen.

Die Effizienz des Elektronentransportes und die Lichtsammelfunktion des Photosystemapparates werden bei Pflanzen durch metabolische und umweltbedingte Konditionen reguliert (Bergantino *et al.*, 1995). Es treten verschiedene Schädigungen auf, wenn die Maiskeimlinge niedriger Temperatur ausgesetzt sind. Hierzu zählen die Abnahme der photosynthetischen Produktivität (Miedema, 1982), die mit Funktionsstörungen von Photosystem II Antenne und Photosystem II Reaktionszentrum verbundene Abnahme der CO₂-Assimilation der Maisblätter (Ortiz-Lopez *et al.* 1990) und eine schlechte Entwicklung des photosynthetischen Apparates (Nie und Baker, 1991). Niedrige Temperatur während der frühen Entwicklungsphase der Pflanze verursacht mangelhafte photosynthetische Leistung (Stirling *et al.*, 1991; Leipner *et al.*, 1999) und verzögert die Pflanzenentwicklung (Miedema, 1982). Die kälteinduzierte Abnahme der photosynthetischen Leistung in Mais ist mit Schäden im Reaktions-Zentrum der Photosystem II (Ortiz-Lopez *et al.*, 1990; Haldimann *et al.*, 1995), den Änderungen des Pigmentaufbaus (Haldimann *et al.*, 1995), der Abnahme der Enzymaktivität des Carbon-Zyklus (Kingston-Smith *et al.*, 1997) und der geänderten Chloroplastenentwicklung (Nie und Baker, 1991; Robertson *et al.*, 1993) assoziiert. Blätter, die bei niedriger Temperatur (15⁰C oder niedriger) entwickelt wurden, zeigen eine sehr niedrige photosynthetische Kapazität (Nie *et al.*, 1992). Bestimmte kühetolerante Maisgenotypen weisen eine effizientere Koordination zwischen Photochemie und Carbonassimilation als die kühesensitiven Maisgenotypen auf (Mauro *et al.*, 1997). Laut Leipner *et al.* (2008) spielt die Kältetoleranz der Maiskeimlinge eine entscheidende Rolle für den späteren Ertrag der Pflanze. Die optimale Wachstumstemperatur für Mais liegt zwischen 20⁰C und 30⁰C. In Mittel- und Nord-Europa betragen die Temperaturen während des frühen Wachstumsstadiums der Maispflanze um 4-15⁰C (Kingston-Smith und Foyer, 2000). Die Kombination aus hoher Lichtintensität und niedriger Temperatur - wie z.B. an einem mitteleuropäischen Frühlingsmorgen - kann dem Maiskeimling dramatische Schäden zufügen

(Freyer *et al.* 1998). Die Menge vieler Proteine der Photosystem I-, Photosystem II- und Cytochrom *b₆/f*-Systeme nimmt während des Wachstums bei 14⁰C ab, wobei die Proteine der Bündelscheiden-Zellen kälteempfindlicher als die der Mesophyllzellen sind (Kingston-Smith und Foyer, 2000). Bei niedrigen Temperaturen wurden unterschiedliche Effekte auf die Entwicklungen der Photosystem I und Photosystem II beobachtet. Photosystem II ist empfindlicher gegenüber niedrigen Temperaturen (Nie und Baker, 1991).

Die in dieser Arbeit analysierte Proteine haben weder vor-, während- und nach der Kälte, noch zwischen den kühesensitiven und kühetoleranten Linien Änderungen gezeigt. Es waren auch keine Unterschiede zwischen den chlorotischen und nicht chlorotischen Blattregionen zu finden. Die Menge vieler Proteine, darunter auch das D1-Protein aus dem Reaktionszentrum des Photosystems II, nimmt während der Kälte ab (Nie und Baker, 1991). Die Maispflanzen, die nach Nie und Baker (1991) Unterschiede im Proteinmuster aufweisen, wurden direkt bei niedrigen Temperaturen (17⁰C und 14⁰C) und bei geringer Lichtintensität (230 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) angezogen. Analysiert wurden die zweiten Blätter, die drei Tage nach der kompletten Entwicklung geerntet worden sind, so dass diese Ergebnisse nicht auf in dieser Arbeit durchgeführte Experimente übertragen werden können. In oben beschriebenem Experiment sind außerdem andere Mais-Linien benutzt worden.

Nach Bergantino *et al.* (1995) wurden die Maispflanzen bei niedrigerer Lichtintensität (200 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 2 Wochen lang angezogen und die Ernte folgte nach 6 Stunden Kältestress (4⁰C). Viele Proteine, wie CP29, CP43, D1, D2 und 9kDa, reagieren auf die Kälte mit Phosphorylierung. Linien, bei denen die Phosphorylierung des Proteins CP29 aktiver läuft, sind resistenter gegenüber der Photoinhibierung (Bergantino *et al.*, 1995). Nicht phosphorylierte Genotypen weisen kälteinduzierte Schäden auf (Mauro *et al.*, 1997). Die Phosphorylierung des Proteins CP29 ist ein Photoschutz-Mechanismus, der auf der Reorganisation der Pigmente im Chlorophyll-Protein-Komplex basiert (Bergantino *et al.*, 1995). Die in der hier vorliegenden Arbeit untersuchten Proteine wie CP29, CP43, und D1 zeigten keine Änderungen in der Kälte. Die Bedingungen der Experimente, die in vorliegender Arbeit durchgeführt worden sind, weichen von den in der Literatur beschriebenen Bedingungen ab und die Resultate stimmen nicht mit denen anderer Publikationen überein. Es könnte sein, dass die Proteine durchaus vorhanden, aber defekt sind. In der max. Quantum-Effizienz der Photosystem II, F_v/F_m , konnte auch kein Unterschied detektiert werden (Karin Ernst, mündliche Mitteilung, unveröffentlicht).

4.3. Analyse der differentiellen Genexpression

Zur Untersuchung einer differentiellen Genexpression in zwei Individuen mit unterschiedlichen Phäno- und/oder Genotypen wird der Vergleich der mRNA-Populationen genutzt. Dies ist eine Methode, die Proteine oder Gene zu identifizieren, welche ausschließlich in einem der beiden Individuen vorhanden sind. In der vorliegenden Arbeit wurde nach Expressionsunterschieden zwischen den sensitiven und toleranten Linien gesucht. Für die Identifizierung differentiell exprimierter Gene, die auf Kälte mit veränderter Expression reagieren, wurde eine subtraktive Hybridisierungs-Methode, die suppressive subtraktive Hybridization (SSH) durchgeführt. Differentiell exprimierte Gene wurden mittels Macroarrayhybridisierung analysiert. Dadurch wurden 288 Klone ausgesucht, die zur weiteren Analyse sequenziert wurden. Es konnten durch wiederholte Macroarrayhybridisierung drei Gene als differentiell exprimiert detektiert werden. Die drei Gene kodieren für: 1. hypothetisches Protein, das in Chloroplasten kodiert wird (Gene id. 4055916, orf121-a-ct, *Zea mays*), 2. Elongations-Faktor 1-alpha (ACG34498.1, *Zea mays*), 3. hypothetisches Protein, dessen Expression noch nicht bewiesen ist (ACG28338.1, *Zea mays*). Die BLAST-Analyse der Fragmente zeigte, dass das Gen, welches Elongations-Faktor 1-alpha kodiert, physikalisch auf dem Chromosom 8 kartiert, die beiden hypothetischen Proteine werden in Chloroplasten kodiert. Die identischen Sequenzen waren allerdings auch in Kern- und Mitochondrien-Genomen zu finden. Durch SSH konnten keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen den kühesensitiven und kühetoleranten Linien in der QTL4-Region detektiert werden. Expressionunterschiede müssen nicht groß sein, um gravierende phänotypischen Unterschiede verursachen zu können (z. B. die apikale Dominanz der Maispflanze, die durch das *tb1* (*teosinte branched 1*) kontrolliert wird (Doebley et al))

Für die weitere Analyse der QTL4-Region und auf der Suche nach Unterschieden zwischen den sensitiven und toleranten Linien in der QTL4-Region wurde bei der KWS eine *Infinium* Chip-Analyse durchgeführt. Für die Analyse wurden die kühesensitive SL- und kühetolerante TH-Linien benutzt. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die QTL4-Region zwischen den Contigs 165 bis 179 bei SL und TH identisch ist. Diese Ergebnisse stimmen mit den SSH-Ergebnissen überein. Für die Untersuchung der Expressionsunterschiede zwischen den kühesensitiven und kühetoleranten Linien wurden auch andere Methoden benutzt. *Affymertix* Chip-Analyse und *Hochdurchsatz-Sequenzierung* wurden mit der kühesensitiven Elter-Linie SL und der toleranten NI-Linie TH-N4-8X durchgeführt (Elena Pestsova, mündliche Mitteilung, unveröffentlicht). Das Ergebnis zeigte, dass die Linien in der QTL4-Region, zwischen den Contigs 164 bis 181, keine signifikanten Unterschiede aufwiesen.

Signifikante Unterschiede zwischen den kühesensitiven und kühetoleranten Linien konnten auf dem Chromosom 9 kartiert werden (nicht veröffentlicht), was mit den in dieser Arbeit geschilderten Ergebnissen der Markerentwicklung übereinstimmt.

5 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, den QTL für den Frischmasseertrag auf dem Chromosom 4 in Mais einzuengen und die genetische Basis der Kühletoleranz zu untersuchen. Für die Untersuchung wurden rekombinante doppelhaploide Linienpopulation (DHL) genutzt, die durch die Kreuzung zwischen den SL- und TH-Linien hergestellt worden sind.

Es wurde ein Phänotyp detektiert, in dem sich die kühesensitiven und kühletoleranten Linien unter Laborbedingungen unterscheiden. Die phänotypischen Analysen zeigten Unterschiede zwischen den kühesensitiven und kühletoleranten Linien nach der Kältebehandlung bei 8⁰C/6⁰C (tags/nachts), die in einer früheren Entwicklungsphase der Pflanzen detektiert werden konnte. Die vierten und fünften Blätter der kühesensitiven Linien wiesen die Blattchlorosen auf.

Die Analyse der DH- und NI-Linien zeigte, dass das Auftreten der Blattchlorose mit der geringen Frischmasseleistung im Feld korreliert, Blattchlorose und Frischmasseertrag genetisch miteinander gekoppelt sind und die QTL4-Region für den Frischmasseertrag eine wichtige Rolle bei der Ausbildung der Kühletoleranz spielt.

Durch den genotypischen und phänotypischen Analysen der NILs und subNILs konnte die QTL4-Region für Frischmasseertrag zwischen den Markern Zm4-5 und Zm4-6 kartiert und auf 4cM eingengt werden. Diese Region umfasst nach physikalischer Karte ca. 122 Mb und macht die Hälfte des Chromosoms 4 aus. Für die Markerentwicklung für den Frischmasse-QTL auf dem Chromosom 4 wurden öffentlich zugängliche Daten aus der Datenbank www.maizesequenze.org genutzt. Es konnten dadurch drei Marker entwickelt werden, die auf dem Chromosom 4, aber außerhalb der QTL4-Region, kartiert werden konnten. Für die weitere Markerentwicklung wurde eine AFLP-Analyse durch die Firma *Keygene* durchgeführt. Dadurch wurden drei Marker für das Chromosom 4 entwickelt, die ebenfalls außerhalb der QTL4-Region kartiert werden konnten.

Die nicht vorhandenen Polymorphysmen zwischen den SL- und TH-Linien in der QTL4-Region könnten ein Hinweis dafür sein, dass diese Linien in der Region identisch sind, oder es gibt durchaus Polymorphysmen zwischen den Linien in der Region durch Nukleotidaustausch, die in 120 Mb jedoch schwer zu detektieren sind.

Summary

The aim of this study was to narrow the Quantitative Trait Loci (QTL) for fresh matter yield on chromosome 4 in maize and to study the genetic basis of chilling tolerance. For the study population recombinant doubled haploid line (DHL) were used which were produced by crossing between the chilling sensitive (SL) and chilling tolerant (TH) lines.

It was detected a phenotype, which differs in the chilling sensitive and chilling tolerant lines under laboratory conditions. The phenotypic analysis showed differences between the chilling sensitive and chilling tolerant lines after cold treatment at 8⁰C/6⁰C (day / night) which could be detected in an earlier phase of development of the plants. The fourth and fifth leaves of chilling sensitive lines exhibited the chlorosis.

The analysis of the DH and near isogenic lines (NILs) showed that the occurrence of chlorosis and little fresh mass performance correlated in the field, chlorosis and fresh weight gain are linked genetically to each other and the QTL region for the fresh matter yield on the chromosome 4 (QTL 4) plays an important role in the development of chilling tolerance.

For marker development for the fresh matter yield QTL on chromosome 4 were used publicly available data from the database www.maizesequenze.org. In this way three markers have been developed that could be mapped on chromosome 4 but outside the QTL4 region. For a further marker development an AFLP analysis was carried out by the company Keygene. Three markers for chromosome 4 were developed that could also be mapped outside the QTL4 region.

By the genotypic and phenotypic analysis of the NILs and subNILs the QTL4 region for fresh matter yield could be mapped between the markers Zm4-5 and Zm4-6 and concentrated to 4cM. This region comprises approximately 122 Mb on the physical map and accounts for half of chromosome 4. The discarded Polymorphisms between the SL- and TH-lines in the QTL4 region could be an indication that these lines are identical in the region, or it might be an indicator for Polymorphisms between the lines in the region through nucleotide-exchange, which are difficult to detect in 122 Mb..

6. Literatur

- Alberda T, (1969) The effect of low temperature on dry matter production, chlorophyll concentration and photosynthesis of maize plants of different ages. *Acta Bot Neerlandica* 18:39-49.
- Barret P., Brinkmann M., Beckert M. (2008) A major locus expressed in the male gametophyte with incomplete penetrance is responsible for *in situ* gynogenesis in maize. *Theor. Appl. Genet.* 117:581-594.
- Bergantino E., Dianese P., Cerovic Z., Sechi S., Bassi R. (1995) A Post-translational Modification of the Photosystem II Subunit CP29 Protects Maize from Cold Stress. *The journal of biological chemistry* 270:8474-8481.
- Blanc G., and Wolfe K.H. (2004) Functional Divergence of Duplicated Genes Formed by Polyploidy during Arabidopsis Evolution. *The Plant Cell* 16:1679-1691
- Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W. (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *Am. J. Hum. Genet.* 32:314-331.
- Bredenkamp G.J., Nie G.Y., Baker N.R. (1992) Perturbation of chloroplast development in maize by low growth temperature. *Photosynthetica* 27: 8474-8481.
- Covshoff S., Majeran W., Lui P., Kolkman J.M., van Wijk K.J., Brutnell T.P. (2008) Dereglulation of Maize C₄ Photosynthetic Development in a Mesophyll Cell-Defective Mutant. *Plant Physiol.* 146:1469-1481.
- Chandler V.L., Brendel V. (2002) The Maize Genome Sequencing Project. *Plant Physiology* 130:1594-1597.
- Coe E.H. (1959) A line of maize with high haploid frequency. *Am Nat.* 93:381-382
- Cone K.C., McMullen M.D., Bi I.V., Davis G.L., Yim Y-S, et al. (2002) Genetic, physical, and informatics resources for maize. *Plant Physiol.* 130:1598-1605.
- Diatchenko L, Chris Lau Y.F. Campbell P, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov E.D, Siebert P.D. (1996) Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:6025-6030.
- Doebley J, Stec A, Hubbard L (1997) The evolution of apical dominance in maize. *Nature* 386:485-488
- Doebley J, Stec A, Gustus C (1995) *teosinte branched1* and the Origin of Maize: Evidence for Epistasis and the Evolution of Dominance. *Genetics* 141:333-346
- Dolstra O., Jongmans M.A., de Jong K. (1988) Improvement and significance of resistance to low-temperature damage in maize (*Zea mays* L.). I. Chlorosis resistance. *Euphytica* 39:117-123.

- Drozak A., Romanowska E (2006) Acclimation of mesophyll and bundle sheath chloroplasts of maize to different irradiances during growth. *Biochem. Biophys. Acta* 1757:1539-1546.
- Falconer D.S. (1984) Einführung in die Quantitative Genetik, Ulmer Verlag, Stuttgart.
- Fernandes J., Brendel V., Gai X., Lal S., Chandler V.L., Elumalai R.P., Galbraith D.W., Pierson E.A., Walbot V. (2002) Comparison of RNA Expression Profiles Based on Maize Expressed Sequence Tag Frequency Analysis and Micro-Array Hybridization. *Plant Physiology* 128:896-910.
- Foyer CH, Vanacker H, Gomez LD, Harbinson J (2002) Regulation of photosynthesis and antioxidant metabolism in maize leaves at optimal and chilling temperatures. review. *Plant Physiol Biochem* 40:659-668
- Fracheboud Y, Ribaut JM, Vargas M, Messmer R, Stamp P (2002) Identification of quantitative trait loci for cold-tolerance of photosynthesis in maize (*Zea mays* L.). *J Exp Bot* 53:1967-1977
- Fracheboud Y, Jompuk C, Ribaut JM, Stamp P, Leipner J (2004) Genetic analysis of cold-tolerance of photosynthesis in maize. *Plant Mol Biol* 56:241-253
- Frary A, Nesbitt T.C, Grandillo S, Knaap E, Cong B, Liu J, Meller J, Elber R, Alpert K. B, Tanksley S.D (2000) *fw2.2*: a quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size. *Science* 289:85-88
- Friedman E, Pleban T, Zamir D (2000) A recombination hotspot delimits a wild-species quantitative trait locus for tomato sugar content to 484 bp within an invertase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:4718-4723
- Fryer MJ, Andrews JR, Oxborough K, Blowers DA, Baker NR. (1998) Relationship between CO₂ assimilation, photosynthetic electron transport, and active O₂ metabolism in leafes of maize in the field during periods of low temperature. *Plant Physiol.* 116:571-580
- Geiger H.H. (2009) Duobled haploids. Pp. 641-659. In J.L. Benetzen, S. hake, *Maize Handbook*. Vol. II: Genetics and Genomics. Springer Verlag, Heidelberg, New York.
- Geiger H. H, Gordillo G. A, (2009) Doubled haploids in hybrid maize breeding. *Maydica* 54:485-499
- Greaves JA (1996) Improving suboptimal temperature tolerance in maize – the search for variation. *J Exp Bot.* 47:307-323
- Gurskaya N.G, Diatchenko L, Chenchik A, Siebert P.D, Khaspekov G.L, Lukyanov K.A, Vagner L.L., Ermolaeva O.D., Lukyanov A.A., Sverdlov E.D. (1996) Equalizing cDNA subtraction based on selective suppression of polymerase chain reaction: cloning of Jurkat cell transcripts induced by phytohemagglutinin and phorbol 12-myristate 13-acetate. *Anal.Biochem.* 240:90-97.

- Haberer G., Young S., Bharti A.K., Gundlach H., Raymond C., Fuks G., Butler Ed., Wing R.A., Rounsley S., Birren B., Nusbaum C., Mayer K.F.X., Messing J. (2005) Structure and Architecture of Maize Genome. *Plant Physiology* 139:1612-1624.
- Haldimann P., Fracheboud Y., Stamp P. (1995) Carotenoid composition in *Zea mays* developed at suboptimal temperature and different light intensities. *Physiologia Plantarum* 95:409-414.
- Haldimann P., Fracheboud Y., Stamp P. (1996) Photosynthetic performance and resistance to photoinhibition of *Zea mays* L. leaves grown at suboptimal temperature. *Plant, Cell and Environment* 19:85-92.
- Heintz D., Erxleben A., High A.A., Wurtz V., Reski R., Van Dorsselaer A., Sarnighausen E. (2006) Rapid alteration of the phosphoproteome in the moss *Physcometrella patens* after cytokinin treatment. *J Proteome Res.* Sep; 5(9):2283-93.
- Hodgins R. and van Huystee R.B. (1986) Porphyrin metabolism in chill-stressed maize (*Zea mays* L.). *Journal of Plant Physiology* 125:325-336.
- Hundt A, Frascaroli E, Leipner J, Jompuk C, Stamp P, Fracheboud Y (2005) Cold tolerance of the photosynthetic apparatus: pleiotropic relationship between photosynthetic performance and specific leaf area of maize seedlings. *Mol Breed* 16:321-331
- Jin W., Melo J.R., Nagaki K., Talbert P.B., Hanikoff S., Dawe R.K., Jiang J. (2004) Maize Centromeres: Organization and Functional Adaptation in the Genetic Background of Oat. *The Plant Cell* 16:571-581.
- Jompuk C, Fracheboud Y, Stamp P, Leipner J (2005) Mapping of quantitative trait loci associated with chilling tolerance in maize (*Zea Mays* L.) seedlings grown under field conditions. *J Exp Bot* 56:1153-1163
- Kingston-Smith A.H., Harbinson J., Williams J., Foyer C.H. (1997) Effect of chilling on carbon assimilation, enzyme activation, and photosynthetic electron transport in the absence of photoinhibition in maize leaves. *Plant Physiology* 114:1039-1046.
- Kingston-Smith A.H., and Foyer C.H. (2000) Bundle sheath proteins are more sensitive to oxidative damage than those of mesophyll in maize leaves exposed to paraquat or low temperatures. *Journal of Experimental Botany* 51:123-130.
- Leipner J, Fracheboud Y, Stamp P (1999) Effect of growing season on the photosynthetic apparatus and leaves antioxidative defenses in two maize genotypes of different chilling tolerance. *Environ Exp Bot* 42:129-139
- Leipner J, Jompuk C, Camp KH, Stamp P, Fracheboud Y. (2008) QTL studies reveal little relevance of chilling-related seedling traits for yield in maize. *Theor Appl Genet* 116:555-562
- Long SP, Nugawela A, Bongi G, Farage PK. (1987) Chilling-dependent photoinhibition of photosynthetic CO₂ uptake. *Progress in photosynthesis research*, Vol. 4.
- Ma J., Wing R.A., Bennetzen J.L., Jackson S.A. (2007) Plant centromere organization: a dynamic structure with conserved functions. *Trends in Genetics* 23:134-139.

Mauro S., Dainese P., Lannoye R., Bassi R. (1997) Cold-Resistant and Cold-Sensitive Maize Lines Differ in the Phosphorylation of the Photosystem II Subunit, CP29. *Plant Physiol.* 115:171-180.

McWilliam J.R, and Naylor A.W, (1967) Temperature and plant adaption. I Interaction of temperature and light in the synthesis of chlorophyll in corn. *Plant Physiol.* 42:1711-1715.

Messing J., Bharti A.K., Karlowski W.M., Gundlach H., Kim H.R., Yu Y., Wie F., Fuks G., Soderlund C.A., Mayer K.F.X., Wing R.A. (2004) Sequence composition and genome organization of maize. *PNAS* 101:14349-14354.

Meyers B.C., Tingey S.V., Morgante M. (2001) Abundance, distribution, and transcriptional activity of repetitive elements in the maize genome. *Genome Res:* 11:1660-1676.

Meyers B.C., Tingey S.V., Morgante M. (2007) Abundance, Distribution, and Transcriptional Activity of Repetitive Elements in the Maize Genome. *Genome Research* 11:1660-1676.

Miedema P (1982) The effects of low temperature on *Zea mays*. *Advances in Agronomy* 35:93-128.

Miedema P, Post J, Groot P. (1987) The effects of low temperature on seedling growth of maize genotypes. *Agricultural Research Reports* 926.

Muldoon DK, Wheeler JL, Pearson CJ. (1984) Growth, mineral composition and digestibility of maize, sorghum and barnyard millets at different temperatures. *Australian Journal of Agrikultural Research* 35:367-378

Nie G.Y., Baker N.R. (1991) Modifikations of thylacoid composition during development of maize leaves at low growth temperatures. *Plant Physiol* 95:184-191

Nie G.Y., Baker N.R. (1991) Modifications to Thylakoid Composition during Development of Maize Leaves at Low Growth Temperatures. *Plant Physiol.* 95:184-191.

Nie G-Y., Long S.P., Baker N.R. (1992) The effect of development at sub-optimal growth temperature on photosynthesis capacity and susceptibility to chilling-dependent photoinhibition in *Zea mays*. *Physiologia Plantarum* 85:554-560.

Ortiz-Lopez A., Nie G.Y., Ort D.R., Baker N.R. (1990) The involvement of the photoinhibition of photosystem II and impaired membrane energization in the reduced quantum yield of carbon assimilation in chilled maize. *Planta* 18:78-84

Pimentel C, Davey PA, Juvil JA, Long SP (2005) Gene loci in maize influencing susceptibility to chilling dependent photoinhibition of photosynthesis. *Photosynth Res* 85:319-326

Pokorska B., Zienkiewick M., Powikrowska M., Drozak A., Romanowska E. (2009) Differential turnover of the photosystem II reaction centre D1 protein in mesophyll and bundle sheath chloroplasts of maize. *Biochimica et Biophysica Acta* 1787:1161-1169.

- Pokorska B., Romanowska E. (2007) Photoinhibition and D1 protein degradation in mesophyll and agranal bundle sheath thylacoids of maize. *Func. Plant Biol.* 34:844-852.
- Presterl T, Ouzunova M, Schmidt W, Möller EM, Röber FK, Knaak C, Ernst K, Westhoff P, Geiger HH (2007) Quantitative trait loci for early plant vigour of maize grown in chilly environment. *Theor Appl Genet* 114:1059-1070
- Rafalski J.A., Vogel J.M., Morgante M., Powell W., Andre C., Tingey S.V. (1996) Generating and using DNA markers in plant. In: Birren B., Lai E., (eds) *Non-mammalian genomic analysis. A practical guide.* Academic Press, New York pp 75-134
- Robertson E.J., Baker N.R., Leech R.M., (1993) Chloroplast thylakoid protein changes induced by low growth temperature in maize revealed by immunocytology. *Plant Cell Enciron.* 16:809-818.
- Röber F.K., Gordillo G.A., Geiger H.H. (2005) *In vivo* haploid induction in maize – Performance of new inducers and significance of doubled haploid lines in hybrid breeding. *Maygica* 50:275-283
- Romanowska E., Kargul J., Powikrowska M., Finazzi G., Nield J., Drozak A., Pokorska B. (2008) Structural Organisation of Photosynthetic Apparatus in Agranal Chloroplasts of Maize. *Journal of biological chemistry* 283:26037-26046.
- Rotarenko V.A., Dicu G., Sarmaniu M. (2009) Induction of maternal haploids in maize. *Maize Genet. Coop. Newsletter* 83
- Salvi S, Tuberosa R, Chiapparino E, Maccaferri M, Veillet S, van Beuningen L, Isaac P, Edwards K, Phillips R.L. (2002) Toward positional cloning of *Vgt1*, a QTL controlling the transition from the vegetative to the reproductive phase in maize. *Plant Molecular Biology* 48:601-613
- Salvi S, and Tuberosa R, (2005) To clone or not to clone plant QTLs: present and future challenges. *Trends in Plant Science* 10:297-304
- Salvi S, Sponza G, Morgante M, Tomes D, Niu X, Fengler K.A, Meeley R, Ananiev E.V, Svtashev S, Bruggemann E, Li B, Hainey C. F, Radovic S, Zaina G, Rafalski J. A, Tingey S. V, Miao G. H, Phillips R. L, Tuberosa R (2007) Conserved noncoding genomic sequences associated with a flowering-time quantitative trait locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104:11376-11381
- San Miguel P., Tikhonov A., Jin Y.K., Motchoulskaia N., Zakharov D., Melake-Berhan A., Springer P.S., Edwards K.J., Lee M., Avramova Z., Bennetzen J.L. (1996) Nested retrotransposons in the intragenic regions of the maize genom. *Science* 274:765-768.
- San Miguel P., Gaut B.S., Tikhonov A., Nakajima Y., Bennetzen J. (1998) The paleontology of intergene retrotransposons of maize. *Nature genetisc* 20:43-45.

- Schapendonk A.H.C.M, Dolstra O, Van Kooten O, (1989) The use of chlorophyll fluorescence as a screening method for cold tolerance in maize. *Photosynthesis Research* 20:235-247.
- Schnable P. S, Ware D., Fulton R., Stein J., Wie F. et al (2009) The B73 Maize Genome: Complexity, Diversity, and Dynamics. *Science* 326: 1112-1115
- Sibov S.T., Lopes de Souza jr C., Garcia A.A.F., Garcia A.F., Rezende Silva A., et al. (2003) Molecular mapping in tropical maize (*Zea mays* L.) using microsatellite markers. 1. Map construction and localization of loci showing distorted segregation. *Hereditas* 139:96-106.
- Stirling C.M., Nie G.Y., Aguilera C., Nugawela A., Long S.P., Baker N.R. (1991) Photosynthetic productivity of an immature maize crop: changes in quantum yield of CO₂ assimilation, conversion efficiency and physiological research. *Russ J Plant Physiol.* 54:15-21
- Stuber C.W., Polacco M., Senior M.L. (1999) Synergy of Empirical Breeding, Marker-Assisted Selection, and Genomics to Increase Crop Yield potential. *Crop Sci.* 39:1571-1583.
- Swigonova Z., Lai J., Ma J., Ramakrishna W., Llaca V., Bennetzen J.L., Messing J. (2004) Close Split of Sorghum and Maize Genome Progenitors. *Genome Research* 14:1916-1923
- Tautz D., and Renz M. (1984) Simple sequences are ubiquitous repetitiv components of eukaryotic genomes. *Nukleic Acids Res.* 12:4127-4137
- Tautz D., (1993) Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences. *Nucleic Acids Res* 21-28
- Tollenaar M, Daynard TB, Hunter RB. (1979) Effect of temperature on rate of leaf appearance and flowering date in maize. *Crop Science* 19:363-366
- Tomkins J.P., Davis G., Main., Yim Y., Duru N., Musket T., Goicoechea J.L., Frisch D.A., Coe E.H., Wing R.A. (2002) Construction and characterization of a deep-coverage bacterial chromosome library for maize. *Crop Sci.* 42:928-933
- Utz H.F., Melchinger A.E. (1996) PLABQTL:a program for composite interval mapping of QTL. *J Quant Trait Loci* 2.
- Van Hasselt PR. (1990). Light-iduced damage during chilling. In:Wang CY, ed. *Chilling injury of horticultural crops*. Boca Raton, Florida: CRC Press, 113-128.
- Van Huystee R.B. and Hodgins R.R.W., (1989) Chlorophyll Synthesis from Protochlorophyll(ide) in Chill-Stressed Maize (*Zea mays* L.). *Journan of Experimental Botany* 40:431-435
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res.* 11:4407-4414.
- Warrington IJ, Kanemasu ET. (1983) Corn growth response to temperature and photoperiod. II. Leaf initiation and leaf apperance rates. *Agronomy Journal* 75:755-762.

Wie F., et al., (2009) The Physical and Genetic Framework of the Maize B73 Genom. PLoS Genetics 5:1-9.

Wilde K., Presterl T., Möller E.M., Ouzunova M., Schmidt W. Geiger H.H. (2005) Untersuchungen zur Züchtung auf Kühletoleranz bei Mais. Bericht über die 56. Tagung 2005 der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs

Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K., Rafalski J.A., Tingey S.V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research 18:6531-6535

Yano M, Katayose Y, Ashikari M, Yamatouchi U, Monna L, Fuse T, Baba T, Yamamoto K, Umehara Y, Nagamura Y, Sasaki T (2000) Hd1, a major photoperiod sensitivity quantitative trait locus in rice, is closely related to the *Arabidopsis* flowering time gene *CONSTANS*. Plant Cell 12:2473-2484

Zabeau M., and Voss P. (1993) Selective restriction fragment amplification: A general method for DNA fingerprinting. Eur. Pat. App.92492629.7 (Publ. Number 0 534 858 A1)

Zheng J., Zhao J., Tao Y., Wang J., Liu Y., Fu J., Jin Y., Gao P., Zhang J., Bai Y., Wang G. (2004) Isolation and analysis of water stress induced genes in maize seedlings by subtractive PCR and cDNA macroarray. Plant Molecular Biology 55:807-823

7. Danksagung

Mit dem Abschluss meiner Doktorarbeit möchte ich mich bei allen bedanken, die mir geholfen haben, dieses Ziel zu erreichen.

Mein Dank geht an:

Prof. Dr. Peter Westhoff dafür, dass er mich und meine Arbeit geduldig betreut hat und ich die Möglichkeit hatte, diese Arbeit an seinem Institut durchführen zu können,

Dr. Karin Ernst, für die nette Betreuung, viel Geduld und Hilfsbereitschaft,

Dr. Elena Pestsova, für die Unterstützung und hilfreiche Diskussionen während der „Teatime“ um 4.Uhr im Aufenthaltsraum, für die Auffrischung meiner Russischkenntnisse und für vieles mehr,

Dagmar Lyska, für die geduldige Einführung in „die Welt der Proteine“...

Christian Wiludda, für immer währende Hilfsbereitschaft...

Maria Koczor, für Ihre Herzlichkeit und für viel gemeinsames Lachen....

Udo Gowik, für die Hilfsbereitschaft, besonders wenn ich nicht wusste was mein Computer von mir wollte....

Steffi Schulze, für die Übernahme meiner Mimose...

Alle Mitglieder und Ehemaligen der Botanik IV für Hilfsbereitschaft und offene Ohren,

Ganz herzlichen Dank an Gerhard Neupert, für die Geduld, für das Korrekturlesen und für vieles mehr!

Ich bedanke mich bei meiner Familie, für Ihre Unterstützung, nicht nur während meiner Doktorarbeit.

Erklärung:

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Düsseldorf, 21.11.2010