

**Die Nutzung neuerer PCR-gestützter molekularer
Markertechniken zur Erstellung einer dicht besetzten
Kopplungskarte des Roggens (*Secale cereale* L.)**

Vom Fachbereich Gartenbau
der Universität Hannover
zur Erlangung
des akademischen Grades eines

Doktors der Gartenbauwissenschaften

- Dr. rer. hort. -

genehmigte
Dissertation

von

Dipl.-Ing. agr. Bernhard Saal
geboren am 4. April 1966 in Weilheim i. OB.

1998

Referent: Prof. Dr. G. Wricke

Korreferent: Prof. Dr. H.-J. Jacobsen

Tag der Promotion: 3.2.1998

Kurzfassung

Die Nutzung neuerer PCR-gestützter molekularer Markertechniken zur Erstellung einer dicht besetzten Kopplungskarte des Roggens (*Secale cereale* L.)

Für die Kartierung und Markierung von Majorgenen und Polygenen ist in vielen Fällen eine dicht besetzte Kopplungskarte erforderlich. Vordringliche Ziele der Roggenzüchtung, wie die vollständige Restauration der Pollenfertilität als Grundlage für die Züchtung von Hybridsorten und die Erzeugung doppelhaploider Linien, können mit Hilfe genetischer Marker schneller und effektiver bearbeitet werden.

Ziel dieser Arbeit war es, neue PCR-gestützte Markertechniken für die Erweiterung und Absättigung der am Institut entwickelten Genkarte zu nutzen. Im Mittelpunkt stand die Entwicklung von SSR-Markern (simple sequence repeats) und die Kartierung von AFLP-Markern (Amplified Fragment Length Polymorphisms).

Von 182 aus genomischen DNA-Bibliotheken isolierten Klonen, die SSRs enthielten, sind 74 sequenziert worden. 56,8 % der SSRs stellten perfekte Motive dar, von denen 62 % vom Typ $(GT/CA)_n$ waren und 38 % das $(CT/GA)_n$ -Motiv trugen. Von 57 entwickelten Primerpaaren erzeugten 27 spezifische Amplifikate im erwarteten Größenbereich. Zwölf dieser SSR-Marker wurden genetisch kartiert, 8 weitere sind mit Hilfe von disomen und ditelosomen Additionslinien Chromosomen oder Chromosomenarmen zugeordnet worden. Mit Ausnahme von Chromosom 4R sind alle Chromosomen mit mindestens 2 SSR-Markern besetzt. Der Polymorphiegrad von SSR-Markern war im Vergleich zu RFLP-, RAPD- und AFLP-Markern in der verwendeten Kartierungspopulation am höchsten. Zusätzlich konnte ein SSR-Marker des Weizens kartiert werden. Die Übertragbarkeit von SSR-Markern zwischen Arten der *Triticeae* gelingt aber nur in wenigen Fällen.

Im Rahmen der Kartierung von AFLP-Markern sind mit 18 *EcoRI/MseI*-Primerkombinationen etwa 1180 Banden analysiert worden, von denen 148 polymorph waren. Es wurden Polymorphiegrade zwischen 5,7 % und 33,3, % gefunden. Aus den 8 Primerkombinationen mit dem höchsten Polymorphiegrad gingen 80 polymorphe Loci hervor, von den 74 kartiert werden konnten. An einigen chromosomalen Regionen traten Cluster mit AFLP-Markern auf.

Nach Integration von Isoenzym- und RFLP-Markern anderer Populationen umfaßt die Kopplungskarte 226 Marker mit einer Gesamtlänge von etwa 1380 cM. Dies entspricht vermutlich einer Genomabdeckung von etwa 80 %. Die Karte enthält 2 morphologische Marker, 19 Isoenzym-, 88 RFLP-, 29 RAPD-, 14 SSR- und 74 AFLP-Marker. Daraus ergibt sich ein durchschnittlicher Markerabstand von 6,1 cM.

In den beiden Populationssorten 'Halo' und 'Danko' wurden Polymorphiegrade von RFLP-, SSR- und RAPD-Markern ermittelt. RFLP- und SSR-Marker wiesen mit 0,43 bzw. 0,61 einen höheren durchschnittlich zu erwartenden Heterozygotiegrad auf als RAPD-Marker (0,30). Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen SSR- und RFLP-Markern konnte nur in der Sorte 'Danko' nachgewiesen werden. Bei Fremdbefruchtern wie Roggen liegt ein wesentlicher Vorteil von SSR-Markern gegenüber RFLPs in der einfachen und schnellen Analyse.

Abstract

The use of recent PCR-based molecular markers for the construction of a dense genetic linkage map of rye (*Secale cereale* L.)

In many cases the mapping of major genes and polygenes requires dense genetic linkage maps. Objectives in rye breeding, for example the complete restoration of pollen fertility in hybrids and the production of doubled haploid lines, can be accomplished in a faster and more efficient way by means of genetic markers.

The research work, documented in this thesis, has focussed on the use of recent polymerase chain reaction (PCR)-based molecular markers in order to extend and saturate a rye genetic map which has been previously developed at the Institute of Applied Genetics, University of Hannover. This was achieved by the development and mapping of rye-specific simple sequence repeat markers (SSRs, microsatellites) and Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLPs).

SSR markers were obtained by screening rye genomic libraries with (CT)₁₀ and (GT)₁₀ oligonucleotide probes, sequencing of positive clones and primer pair construction. 74 out of 182 clones which contained SSRs were sequenced. Perfect repeats were found in 56.8 % of these clones. 62 % of the perfect repeats represented the (GT/CA)_n motif, the remainder were (CT/GA)_n-SSRs. Construction of 57 primer pairs has resulted in 27 specific SSR markers with PCR products within the expected size range. Twelve SSR markers could be genetically mapped, 8 more markers were chromosomally localized by means of disomic and ditelosomic wheat-rye addition lines. With the exception of chromosome 4R any of the 7 rye chromosomes is covered with at least 2 SSR markers. Additionally, one previously described SSR marker of wheat could be mapped. However, the transferability of SSR markers between species of the *Triticeae* seems to be low. In the F₂ mapping population the polymorphic level of SSR markers was higher compared with RFLP, RAPD and AFLP markers.

In mapping studies with AFLP markers a total of 1180 bands resulting from 18 *EcoRI/MseI* primer combinations has been analyzed and 148 bands were found to be polymorphic in the mapping population. Polymorphic levels between primer combinations ranged from 5.7 % to 33.3 %. 80 polymorphic loci resulted from the 8 most polymorphic combinations and 74 of them could be integrated into the genetic map. Some chromosomal regions revealed clusters of AFLP markers.

Upon integration of isozyme and RFLP markers from other mapping populations the combined linkage map comprises 226 markers and has a total length of about 1380 cM which is assumed to be about 80 % of the whole rye genome. The map consists of 2 morphological markers, 19 isozymes, 88 RFLP, 29 RAPD, 14 SSR and 74 AFLP markers. This corresponds to an average marker distance of 6.1 cM.

Levels of polymorphisms of a subset of RFLP, RAPD and SSR markers have been evaluated in the open pollinated cultivars 'Halo' and 'Danko'. RFLP and SSR markers showed an average heterozygosity of 0.43 and 0.61, respectively, and were superior to RAPD markers (0.30). However, a statistically significant difference between SSR and RFLP markers could be only established for the cultivar 'Danko'. Therefore, the major advantage of SSR markers over RFLP markers in outcrossing crops such as rye lies in their easy and fast analysis.

Schlagworte: Roggen
Molekulare Marker
Genetische Karte

Keywords: rye
molecular markers
linkage map

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungen	
1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	6
2.1 Pflanzenmaterial	6
2.1.1 Erstellung und Erhaltung der F ₂ -Kartierungspopulation	6
2.1.2 Weizen-Roggen-Additionslinien	6
2.2 DNA-Marker	8
2.2.1 DNA-Isolierung	8
2.2.2 Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLPs)	9
2.2.2.1 Sonden für den Nachweis von RFLPs	9
2.2.2.2 Methodik zur Darstellung von RFLPs	10
2.2.3 Random Amplified Polymorphic DNAs (RAPDs)	13
2.2.3.1 Dekamer-Primer	13
2.2.3.2 Methodik zur Darstellung von RAPDs	14
2.2.4 Simple Sequence Repeats (SSRs, Mikrosatelliten)	14
2.2.4.1 Erstellung genomischer DNA-Bibliotheken	15
2.2.4.2 Sichtung der Bibliotheken mit synthetischen Oligonukleotiden	20
2.2.4.3 <i>in vivo</i> -Exzision	22
2.2.4.4 Sequenzierung	23
2.2.4.5 Konstruktion von Primerpaaren	24
2.2.4.6 PCR-Bedingungen	25
2.2.4.7 Elektrophoresebedingungen und Detektion	26
2.2.5 Amplifikationsfragment-Längenpolymorphismen (AFLPs)	27
2.2.5.1 Primerkombinationen	27
2.2.5.2 Restriktion und Ligation	28
2.2.5.3 Präselektive und selektive Amplifikation	29
2.2.5.4 Auftrennung und Detektion	31
2.3 Datenanalyse	31
2.3.1 Kopplungskarte	31
2.3.1.1 Spaltungsanalysen	31
2.3.1.2 Kopplungsanalysen und Kartenerstellung	32
2.3.2 Untersuchungen zum Polymorphiegrad molekularer Marker	34

2.3.2.1 Schätzung von Allelhäufigkeiten	34
2.3.2.2 Maßzahlen für die Variation von Markern	36
3. Ergebnisse	38
3.1 Molekulare Marker	38
3.1.1 RFLPs	38
3.1.2 RAPDs	40
3.1.3 Simple Sequence Repeats (SSRs)	41
3.1.4 AFLPs	53
3.2 Erstellung einer dicht besetzten Genkarte	57
3.2.1 Spaltungsanalysen	57
3.2.2 Kopplungsanalysen	62
3.2.3 Verbundene Kopplungskarten für die Chromosomen 5R und 6R	71
3.3 Untersuchungen zum Polymorphiegrad molekularer Marker	76
3.3.1 RFLPs	76
3.3.2 RAPDs	77
3.3.3 SSRs	78
3.3.4 Maßzahlen für den Polymorphiegrad molekularer Marker	81
4. Diskussion	83
4.1 Entwicklung von SSR-Markern bei Roggen	83
4.2 Kartierung von AFLP-Markern bei Roggen	90
4.3 Erstellung einer dicht besetzten Genkarte des Roggens	93
4.4 Maßzahlen für den Polymorphiegrad zur Bewertung von Markersystemen	103
5. Zusammenfassung	107
6. Literatur	109
7. Anhang	120

Abkürzungen

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
cfu	Colony forming units
CIAP	Calf Intestine Alkaline Phosphatase
cM	Centimorgan
DEAE	Diethylaminoethyl
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
F	Testgröße in der Varianzanalyse
h	Stunden
H ₂ O _{dd}	bidestilliertes Wasser
I _{0,1}	Selbstungsnachkommenschaft einer nicht ingezüchteten Pflanze
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
M	Molar
Mbp	Megabasenpaare
min	Minuten
N ₂ liqu.	flüssiger Stickstoff
P	Irrtumswahrscheinlichkeit
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
pfu	Plaque forming units
PIC	Polymorphic information content
PIPES	Piperazin-N,N'-bis[2-ethansulfonsäure]
PVP 400	Polyvinyl-Pyrrolidon MW=400000
QTL	Quantitative trait locus
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunden
SSC	Standard saline citrate
SSR	Simple sequence repeat
STS	Sequence Tagged Site
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
T _m	Schmelztemperatur der DNA
Tris	Tris[hydroxymethyl]aminomethan
Vol.	Volumen
xg	Zentrifugalbeschleunigung, ausgedrückt in g (9,8 ms ⁻²)
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-Indolyl-β-D-Galaktosid

1. Einleitung

Genetische Marker haben im Laufe der letzten beiden Jahrzehnte für die Genetik als solche, aber auch für die praktische Pflanzenzüchtung sehr an Bedeutung gewonnen (WEBER und WRICKE 1994). Ein genetischer Marker stellt einen Referenzpunkt mit eindeutigen Phänotyp dar, der einem bestimmten DNA-Abschnitt zugeordnet werden kann. Er ist durch einen genetischen Polymorphismus, das heißt durch das Auftreten von zwei oder mehr Typen, deren Häufigkeiten nicht durch rekurrente Mutationen erklärbar sind (WRICKE 1972), gekennzeichnet. Der Phänotyp kann auf unterschiedlichen Stufen erfaßt werden. Während morphologische Marker direkt an der Pflanze erkennbar sind, erfordern biochemische, cytologische und molekulare Marker für ihre Darstellung einen mehr oder weniger hohen labortechnischen Aufwand. In einem sehr hohen Maße haben molekulare Marker, auch DNA-Marker genannt, die genetische Forschung beeinflusst. Mit ihrer Hilfe können direkt auf der Ebene der DNA Mutationen nachgewiesen werden, die nicht an der Merkmalsausprägung beteiligt sein müssen. Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in Verbindung mit hitzestabilen DNA-Polymerasen hat zudem die Entwicklung PCR-gestützter Markersysteme vorangetrieben. Auf der Basis molekularer Marker war auch die Erstellung dicht besetzter Kopplungskarten möglich und damit die Voraussetzung geschaffen für die Markierung von Genen und deren Isolierung über das sogenannte „map-based cloning“.

Für die Selektion agronomisch wichtiger Eigenschaften können genetische Marker auch beim Kulturroggen (*Secale cereale* L.) eine wertvolle Hilfe leisten. Kurzfristig sind Verbesserungen der Antherenkultureignung sowie der Restorerfähigkeit für die Züchtung von Hybridsorten (DEIMLING *et al.* 1997, MIEDANER *et al.* 1997), mittelfristig aber vor allem die Auslese von Krankheitsresistenzen und Qualitätseigenschaften eine wesentliche Aufgabe der Züchtung bei Roggen. Die Züchtungsforschung muß daher die Voraussetzungen für eine effektive Selektion auf diesen Gebieten schaffen, welche in Verbindung mit dem Einsatz genetischer Marker erfolgreich sein kann. Ein grundlegender Schritt für die Verwendung von Markern besteht darin, möglichst das vollständige Genom mit Markern abzusättigen, das heißt, eine dicht besetzte Genkarte des Roggens anzustreben.

Bei einer Reihe wichtiger Kulturpflanzenarten konnten mit Hilfe von Isoenzym- und molekularen Markern bereits dicht besetzte Kopplungskarten erarbeitet werden (TANKSLEY *et al.* 1992, HEUN *et al.* 1991). Mit Ausnahme der Gerste besteht bei den europäischen Getreidearten noch ein Mangel an einer ausreichenden Anzahl an Markerloci. Für den Roggen existieren zur Zeit mehrere, voneinander unabhängige genetische Karten oder Karten einzelner Chromosomen (DEVOS *et al.* 1993b, PHILIPP *et al.* 1994, WANOUS und GUSTAFSON 1995, WANOUS *et al.* 1995, LOARCE *et al.* 1996, SENFT und WRICKE 1996, KORZUN *et al.* 1997).

Eine erste, auf **Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen** (RFLPs) basierende Chromosomenkarte des Roggens wurde von WANG *et al.* (1991) für Chromosom 1R vorgestellt. Weitere folgten für die Chromosomen 2R, 3R, 4R, 5R und 7R (DEVOS *et al.* 1992, 1993a, LIU *et al.* 1992, ROGNLI *et al.* 1992). Bei diesen Arbeiten erfolgte die Erstellung von Kopplungskarten unter Verwendung von genomischen und cDNA-Sonden des Weizens. Damit war es auch möglich, die Frage der Homöologiebeziehungen zwischen den beiden Getreidearten weiter aufzuklären. Eine Zusammenfassung dieser Untersuchungen und eine erste molekulare Karte des gesamten Roggengenoms, bestehend aus 9 biochemischen und 147 RFLP-Markern, lieferten DEVOS *et al.* (1993b), die auch eine Hypothese für die Evolution des Roggengenoms aus einem „Vorläufergenom“ der *Triticeae* vorstellen.

Die erste Genkarte des Roggens, die roggen-spezifische RFLP-Marker enthält, wurde von PHILIPP *et al.* (1994) veröffentlicht. Daneben wird zum ersten Mal der Einsatz von **Random Amplified Polymorphic DNA**-Markern (RAPDs) (WILLIAMS *et al.* 1990) für die Genkartierung beim Roggen beschrieben. Diese, am Institut für Angewandte Genetik der Universität Hannover erstellte, auf mehreren Inzuchtlinien basierende Kopplungskarte enthielt 60 Loci, darunter morphologische, physiologische, Isoenzym- sowie RFLP- und RAPD-Marker. SENFT und WRICKE (1996) erweiterten diese Genkarte unter Verwendung einer zusätzlichen F₂-Kartierungspopulation, aus der 92 Isoenzym-, RFLP- und RAPD-Marker hervorgingen. Eine auf sämtliche Kartierungspopulationen basierende Gesamtkarte beinhaltet über 127 Marker und umfaßt eine Gesamtlänge von etwa 760 cM (SENFT und WRICKE 1996). In dieser Karte sind auch Gene für wirtschaftlich wichtige Eigenschaften, namentlich ein dominantes Mehltreueresistenzgen *Pm* (WRICKE *et al.* 1996) und die beiden Inkompatibilitätsloci *S* und *Z* (WRICKE und WEHLING 1985, GERTZ und WRICKE 1989) berücksichtigt. Ein Teil der RFLP-Marker in der Karte geht auf Sonden von Weizen und Gerste zurück. Die Untersuchungen von SENFT und WRICKE (1996) zu RAPD-Markern schlossen auch ein modifiziertes Protokoll nach RIEDE *et al.* (1994) ein, jedoch war der Anteil kartierter Marker mit 7,9% weiterhin zu gering, um die Genkarte beträchtlich anzureichern. Einen ähnlich niedrigen Polymorphiegrad von RAPD-Markern ermittelten LOARCE *et al.* (1996), der in ihrem Material durchschnittlich 5,5% betrug. Ein Grund dafür, daß sich viele RAPD-Primer nicht für die Genkartierung bei Roggen eignen, beruht auf der eingeschränkten Reproduzierbarkeit, die möglicherweise auf die komplexe Genomstruktur des Roggens zurückzuführen ist. Zudem ist aufgrund der unspezifischen Anlagerung der Dekamer-Primer nicht immer davon auszugehen, daß PCR-Produkte ähnlicher Größe zueinander ortholog sind. Untersuchungen bei Weizen zeigen, daß die einmal ermittelten Amplifikationsbedingungen exakt eingehalten werden müssen, um zu gleichen Ergebnissen zu gelangen (DEVOS und GALE 1992). Diese Forderung ist

in der Praxis nicht immer gewährleistet. Insgesamt gesehen trugen RAPD-Marker bisher nur wenig zur Abdeckung des Roggengenoms mit molekularen Markern bei.

Ein neuer Beitrag zur Aufklärung der Beziehung zwischen genetischer und physikalischer Länge einzelner Roggenchromosomen wurde von WANOUS und GUSTAFSON (1995) sowie WANOUS *et al.* (1995) beigesteuert. So verwendeten die Autoren als Kreuzungseltern ihrer Kartierungspopulation Linien mit polymorphen terminalen C-Banding-Mustern und konnten damit die physikalischen Enden der Roggenchromosomen 1R, 6R und 7R zusammen mit homologen und homöologen RFLP-Markern genetisch kartieren. Die Einbeziehung solcher cytologischer Marker führte jedoch zu einem drastischen Anstieg der genetischen Gesamtlänge dieser Chromosomen, welcher zuvor in anderen Untersuchungen nicht beobachtet wurde. Es konnte nicht geklärt werden, ob Umwelteinflüsse oder genotypische Unterschiede in den Kreuzungseltern dafür verantwortlich sind oder Regionen mit bisher nicht aufgedeckter Rekombination diesen Befund erklären. Die zuletzt genannte Hypothese hätte zur Folge, daß sehr viel mehr Marker zur Abdeckung des Roggengenoms nötig sein würden.

Wie bereits bei WANOUS und GUSTAFSON (1995) und WANOUS *et al.* (1995) kamen für die RFLP-Kartierung bei LOARCE *et al.* (1996) neben genomischen und cDNA-Sonden von Weizen, Gerste und Hafer auch genomische Roggensonden zum Einsatz. Diese zeigten im Vergleich zu den heterologen Sonden einen deutlich höheren Polymorphismus (65,6%). Die Untersuchungen von SENFT und WRICKE (1996) konnten diese Beobachtung nicht bestätigen. Hier zeigten alle Sonden mit im Durchschnitt etwa 36% einen erstaunlich niedrigen Polymorphiegrad. Es sind aber in diesen Untersuchungen nur vier statt sechs Restriktionsenzyme verwendet worden. Allerdings kann dieser Umstand allein nicht die große Differenz erklären. Vielmehr scheint die dort verwendete Kartierungspopulation über einen geringeren Anteil spaltender Loci zu verfügen.

Eine erst vor kurzem vorgestellte Genkarte des Roggens von KORZUN *et al.* (1997) basiert auf 88 RFLPs, 2 morphologische Marker und einem Isoenzym. Auch hier war der Polymorphiegrad insbesondere von RFLP-Sonden des Roggens und Weizens (75% bzw. 66%) mit durchschnittlich 59 % höher als bei SENFT und WRICKE (1996). Die Koppelungskarte resultiert aus zwei Karten, die für reziproke F₂-Nachkommenschaften erstellt wurden. Mit Ausnahme einiger Regionen auf den Chromosomen 1R, 3R und 5R konnte insgesamt eine gute Übereinstimmung der Markerreihenfolgen und -abstände festgestellt werden, so daß die Konstruktion einer einzigen Karte aus den beiden einzelnen keine größeren Probleme bereitete.

Würde man die Ergebnisse aller eben genannten Arbeiten zusammenfassen, so könnte derzeit das Genom des Roggens mit 250 bis 300 Markern kartiert werden. Insgesamt sind bisher mehr als 720 im Roggen kartierte Gen- und Markerloci bekannt (SCHLEGEL und

MELZ 1996). Allerdings steht bis heute keine Referenzpopulation zur Verfügung, mit der sich eine einzige, dicht besetzte Kopplungskarte erzeugen ließe.

Mit einer solchen Karte sollte für jedes agronomisch wichtige Merkmal ein eng gekoppelter Marker oder ein Markerintervall zur Verfügung stehen. Außerdem kann eine Auswahl von Markern, die nahezu das ganze Genom abdecken, für Rückkreuzungsprogramme von Nutzen sein.

Die Anwendbarkeit eines Markers in einem Zuchtprogramm ist aber auch vom Aufwand für seine Analyse abhängig. Die Kosten für die Durchführung einer RFLP-Analyse sind nach wie vor sehr groß und verhindern häufig die Einführung dieser Methodik in das Züchterlabor. Hingegen kann mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) bereits mit geringen DNA-Mengen in relativ kurzer Zeit eine Reihe von Markern analysiert werden. Solche Marker sind auch einer Automatisierung leichter zugänglich. Neben den RAPD-Markern zählen dazu die in jüngster Zeit an Bedeutung gewinnenden simple sequence repeats (SSRs), auch Mikrosatelliten-Marker genannt, und Amplifikationsfragment-Längenpolymorphismen (AFLPs) (VOS *et al.* 1995). Ein routinemäßiger Einsatz von RAPDs scheint, wie bereits weiter oben beschrieben, bei nahezu allen europäischen Getreidearten aufgrund der nicht immer gegebenen Reproduzierbarkeit an seine Grenzen zu stoßen. Die Nutzung von spezifischen Primern, die im Falle von SSRs und AFLPs gegeben ist, umgeht dieses Problem. Bei SSRs handelt es sich um einfache Sequenzmotive einer Länge von einem bis wenige Basenpaare (bp), die sich viele Male hintereinander anordnen, was als tandemrepetitiv bezeichnet wird. Es handelt es sich bei SSRs um ein hoch informatives, multialleles System, das durch die unterschiedliche Anzahl der aufeinanderfolgender Wiederholungseinheiten charakterisiert ist. Während die Primerpaare für einen SSR relativ spezifisch sind und daher nur einen oder wenige Loci amplifizieren, handelt es sich bei den AFLPs um eine Fingerprint-Technik, bei der ein komplexes Bandenmuster erzeugt wird, welches durch selektive Amplifikation von bestimmten Restriktionsfragmenten entsteht. Da sich in der Regel die zwei zu einem Locus gehörenden Banden selten auffinden lassen, werden einzelne, mit Null-Allel spaltende polymorphe Banden ausgewertet, die dann einem dominanten Erbgang folgen. Mit der AFLP-Technik läßt sich bei einem Pflanzenmaterial mit einem entsprechenden Polymorphiegrad in relativ kurzer Zeit eine große Anzahl an Markern gewinnen, die auch zur Feinkartierung von Genen eingesetzt werden können (MEKSEM *et al.* 1995). Die Entwicklung von SSR-Markern ist langwierig und teuer, denn sie setzt die Klonierung und Isolierung der entsprechenden Zielsequenzen einschließlich der benachbarten Regionen voraus. Außerdem muß für jeden Locus ein eigenes Primerpaar entworfen werden.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation ist es gelungen, weitere RFLP- und RAPD-Marker zu integrieren. Die oben beschriebenen Schwierigkeiten bei RAPD-Markern und

die Nachteile der RFLP-Analyse führten aber dazu, daß das Schwergewicht auf die Erzeugung von SSR-Markern gelegt wurde. Im letzten Abschnitt der Arbeiten konnten auch AFLP-Marker in die Karte eingefügt werden (SAAL und WRICKE 1997). Die am Institut für Angewandte Genetik entwickelte Genkarte wurde erheblich angereichert und umfaßt nun 226 Marker mit einer Gesamtlänge von etwa 1380 cM. Außerdem ist von einigen RFLPs, RAPDs und SSR-Markern des Roggens der Polymorphiegrad in den Populationssorten `Halo´ und `Danko´ erfaßt worden.

2. Material und Methoden

2.1 Pflanzenmaterial

2.1.1 Erstellung und Erhaltung der F_2 -Kartierungspopulation

Für die Kartierungsstudien stand die bereits von SENFT (1996) verwendete F_2 -Population zur Verfügung. Aus einer synthetischen Population, die aus der freien Abblüte der Populationssorten 'Carstens', 'Petkuser Kurzstroh', 'Armaldo' und zu einem geringen Anteil 'Heines Hellkorn' hervorging und in welche die Selbstfertilität aus 'Dakold' eingekreuzt wurde, sind Einzelpflanzen einmal geselbstet und die daraus resultierenden $I_{0,1}$ -Linien auf Isoenzym polymorphismen überprüft worden. Aus verschiedenen Linien wurden zwei Einzelpflanzen ausgelesen, deren Anteil an spaltenden Isoenzymloci möglichst aller 7 Roggenchromosomen hoch war, und anschließend gekreuzt. Durch Selbstung einer F_1 -Pflanze mit den häufigsten heterozygoten Isoenzymloci entstand eine F_2 -Population mit 137 Individuen. Aufgrund der eingekreuzten Selbstfertilität war damit eine für die dichte Kartierung des Roggen-genoms ausreichende Anzahl an Nachkommen gesichert, wie sie bei der Nutzung der Pseudokompatibilität (WRICKE 1978) nicht immer garantiert werden kann.

Um die Kartierungspopulation auf Dauer zu erhalten, wurde aus jeder F_2 -Einzelpflanze eine F_3 -Familie erzeugt ($F_{2,3}$), deren Inzuchtniveau bei nachfolgender isolierter Abblüte erhalten bleibt ($F_{2,4}$). Für die DNA-Isolierung wurden Blätter von mindestens 16 Pflanzen zusammen abgeerntet, um mit sehr großer Wahrscheinlichkeit den F_2 -Markergenotyp zu erhalten. Das Saatgut der $F_{2,3}$ bzw. $F_{2,4}$ kann bei -20°C über mehrere Jahre ohne Verlust der Keimfähigkeit gelagert werden.

2.1.2. Weizen-Roggen-Additionslinien

Die chromosomale Lokalisation von roggen-spezifischen PCR-Banden läßt sich durch Nutzung von Weizen-Roggen-Aneuploiden feststellen. Sowohl vollständige Chromosomenadditionen als auch ditelosome Additionen einiger Chromosomenarme der Sommerroggen-Sorte 'Imperial' (Imp) zur Sommerweizen-Linie 'Chinese Spring' (CS) sind freundlicherweise von Dr. S. Reader, John Innes Centre, Norwich, Großbritannien zur Verfügung gestellt worden. Die cytologische Konstitution der einzelnen Additionslinien ist in Tabelle 2.1 dargestellt. Bisher ist es nicht gelungen, für das Chromosom 2R vollständige disome Additionen zu erzeugen, so daß lediglich heteromorphe Linien analysiert werden können. Daneben wurden einige Additionen der Winterroggen-Sorte 'Kings II' (K II) zur Weizenlinie 'Holdfast' (H), welche am Institut weitergeführt wurden, in die Untersuchungen einbezogen.

Tabelle. 2.1: Bezeichnung, cytologische Charakterisierung und Herkunft der untersuchten disomen und ditelosomen Weizen/Roggen-Additionslinien

Bezeichnung	cytologische Konstitution	Herkunft
CS + 1R Imp	21'' + 1R''	S. Reader, Norwich
CS + 1RS Imp	21'' + 1RS''	''
CS + 1RL Imp	21'' + 1RL''	''
CS + 2R Imp	21'' + 2R' oder 21'' + 2R' + 2RL'	''
CS + 2RL Imp	21'' + 2RL''	''
CS + 3R Imp	21'' + 3R''	''
CS + 3RS Imp	21'' + 3RS''	''
CS + 4R Imp	21'' + 4R''	''
CS + 4RS Imp	21'' + 4RS''	''
CS + 4RL Imp	21'' + 4RL''	''
CS + 5R Imp	21'' + 5R''	''
CS + 5RS Imp	21'' + 5RS''	''
CS + 5RL Imp	21'' + 5RL''	''
CS + 6R Imp	21'' + 6R''	''
CS + 6RS Imp	21'' + 6RS''	''
CS + 6RL Imp	21'' + 6RL''	''
CS + 7R Imp	21'' + 7R''	''
CS + 7RS Imp	21'' + 7RS''	''
CS + 7RL Imp	21'' + 7RL''	''
H + 1R K II	21'' + 1R''	G. Röbbelen, Göttingen
H + 2R K II	21'' + 2R''	''
H + 6R K II	21'' + 6R''	''

2.1.3 Populationsorten des Winterroggens

Für die Schätzung von Allelhäufigkeiten und Maßzahlen für den Polymorphiegrad von DNA-Markern wurden zwischen 24 und 76 Einzelpflanzen der Winterroggen-Sorten 'Halo' und 'Danko' analysiert.

2.2 DNA-Marker

2.2.1 DNA-Isolierung

Isolierung von Roggenchromatin

Für die Erstellung genomischer Banken zur Isolierung von SSRs ist es von Vorteil, ausschließlich nukleäre DNA für die Untersuchungen heranzuziehen. Die Isolierung von Roggenchromatin erfolgte gemäß dem Protokoll von STEINMÜLLER und APEL (1984), das auch von PHILIPP (1992) für die Entwicklung von genomischen DNA-Sonden benutzt worden ist. Sämlinge der Sorte 'Carokurz' wurden für 7 Tage bei 25°C im Dunkeln angezogen, um die Bildung sekundärer Inhaltsstoffe zu reduzieren. 50 g des in N₂ liqu. gemörserten Blattmaterials wurden in 125 ml Isolationspuffer resuspendiert und auf Eis bis zur vollständigen Homogenisierung geschüttelt. Nach einer Filtration durch ein 100 µm-Nylongewebe erfolgte eine Zentrifugation für 15 min bei 9000 rpm (Rotor A6.14) bei 0°C. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und das Pellet mit Hilfe eines Pinsels in 75 ml Isolationspuffer gelöst. Nach erneuter Zentrifugation bei 6500 rpm für 15 min sowie Resuspension des Pellets in 50 ml Isolationspuffer wurde ein letzter Zentrifugationsschritt unter den zuletzt genannten Bedingungen durchgeführt. Das Roggenchromatin enthaltende Pellet wurde an der Luft getrocknet und einer DNA-Extraktion unterzogen.

Isolationspuffer: 20 mM	Tris (HCl) pH 8.0
250 mM	Saccharose
5 mM	MgCl ₂
5 mM	KCl
40%	Glycerin
0,25 %	Triton X-100
0,1 %	β-Mercaptoethanol

DNA-Extraktion

Diese nach SHARP *et al.* (1988) modifizierte Methode ist für die RFLP-Analyse geeignet und diente auch zur weiteren Behandlung des Roggenchromatins. Hierfür wurden ein Viertel des oben genannten Pellets bzw. 2 g gemörsertes Blattmaterial in 15 ml

Extraktionspuffer gelöst und mit 100 µl einer ProteinaseK-Lösung (20 mg/ml) bei 56°C für 10 min und nachfolgend bei 37°C für 1h behandelt. Es erfolgte anschließend eine Extraktion mit 1 Vol. Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (50:48:2) und eine Phasentrennung durch Zentrifugation bei 12000 rpm für 15 min (Rotor A8.24). Die wässrige Phase wurde mit 1 Vol. Chloroform:Isoamylalkohol (96:4) extrahiert und unter den zuvor genannten Bedingungen zentrifugiert. In der Folge wurde der Extrakt mit 0,6 Vol. kaltem Isopropanol versetzt und für mindestens 30 min gefällt. Nach Zentrifugation bei 4°C und 15000 rpm für 30 min bildete sich ein Pellet, das nach Trocknen an der Luft in 5 ml TE aufgenommen und unter leichtem Schütteln gelöst wurde. RNA ist in Anwesenheit von 2 µl RNase A (10 mg/ml) abgebaut worden. Die Entfernung von Polysacchariden erfolgte nach der Methode von MANNING (1991). Die Na⁺-Konzentration der DNA-Lösung wurde dazu auf 80 mM mit Hilfe von 3 M Na-Acetat (pH 4.5) eingestellt, anschließend mit 0,4 Vol. Ethylenglykol-Monobutylether (2-BE) gemischt und für mindestens 30 min auf Eis gestellt. Eine zehnmünütige Zentrifugation bei 15000 rpm bei 0°C führte zur Entstehung eines gelatinösen Pellets, in dem sich Polysaccharide angereichert haben. Der Überstand wurde mit 2,5 Vol. kaltem 100% EtOH aufgefüllt und über Nacht gefällt. Die DNA konnte nach Zentrifugation bei 15000 rpm für 30 min pelletiert werden und wurde nachfolgend mit 70% EtOH gewaschen. Nach Trocknung wurde das Pellet in 500 µl TE aufgenommen und die DNA-Konzentration mit Hilfe einer λ-Meßreihe bestimmt.

Extraktionspuffer:	100 mM	Tris (HCl) pH 8.5
	100 mM	EDTA
	50 mM	NaCl
	2 %	SDS

2.2.2 Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLPs)

2.2.2.1 Sonden für den Nachweis von RFLPs

Als Sonden standen genomische und cDNA-Klone des Roggens (*Xiag*) zur Verfügung. Außerdem sind der Triticin-cDNA-Klon *Tri25-11* und die ribosomale 5S-DNA-Sonde *pScT7*, die von Dr. P. Langridge (Waite Agricultural Research Institute, Adelaide, Australien) bereitgestellt worden sind, in die Untersuchungen einbezogen worden. Die genomischen Roggenklone stammen aus dem Institut für Angewandte Genetik, die im Rahmen der Arbeit von PHILIPP (1992) entstanden. Im Rahmen eines von der DFG geförderten Forschungsprojektes zur Charakterisierung und Isolierung der Selbstinkompatibilitätsloci des Roggens wurde von Bernd Hackauf (jetzt Bundesanstalt für Züchtungsforschung, Groß-Lüsewitz) und Dirk Becker (ehemals Institut für Biophysik,

Universität Hannover) eine cDNA-Bank aus ungekeimten und gekeimten Pollenkörnern des Roggens erstellt. Diese cDNAs liegen in Form einer λ -Bank vor. Nach einer *in vivo*-Exzision wurde eine Auswahl von Klonen gepickt, diese in LB-Medium angezogen und daraus DNA-Inserts isoliert (Kapitel 2.2.4.3). Insgesamt wurden 40 cDNA-Klone auf Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus in der Kartierungspopulation untersucht.

2.2.2.2 Methodik zur Darstellung von RFLPs

Plasmid-Präparation

Zur Vermehrung der Klone wurden 4 ml LB unter Zusatz von 4 μ l des entsprechenden Antibiotikums (genomische Klone: Ampicillin (20 mg/ml); cDNA-Klone: Kanamycin (50 mg/ml)) mit dem Abstrich aus der Glycerinkultur (genomische Klone) bzw. einer Kolonie (cDNA-Klone) angeimpft und über Nacht unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Die Bakterien sind durch zweiminütiges Zentrifugieren bei 15000 rpm in Eppendorfgefäßen pelletiert worden. Die Isolierung der Plasmid-DNA aus den Bakterien erfolgte nach dem QIAprep-spin-Protokoll (QIAGEN, Heidelberg). Hierzu wurden die Bakterien nach RNase-Behandlung lysiert, die Zellwandbestandteile ausgefällt und zentrifugiert und die Plasmid-DNA im Überstand an eine Säule gebunden. Nach zwei Waschschritten wurde die Plasmid-DNA mit 100 μ l TE (pH 8.0) eluiert.

Isolierung des Inserts

Die im Plasmid inserierte Roggen-DNA wurde entweder durch Restriktion mit *Hind*III und *Pst*I oder mittels PCR-Amplifikation mit T3- und T7-Vektorprimern isoliert. Ein Restriktionsansatz wurde in einem Volumen von 30 μ l durchgeführt:

24 μ l	Plasmid-DNA
1,5 μ l	<i>Hind</i> III (15 U; Gibco BRL)
1,5 μ l	<i>Pst</i> I (15 U; Gibco BRL)
3 μ l	10x Reaktionspuffer (Gibco BRL)

Die PCR-Reaktion fand in einem Volumen von 50 μ l statt:

5 μ l	Plasmid-DNA (2 ng/ μ l)
4 μ l	dNTPs (je 2,5 mM)
5 μ l	Primer T3 (20 mM)
5 μ l	Primer T7 (20 mM)
5 μ l	10x Puffer (500 mM KCl, 100 mM Tris HCl pH 8.5, 15 mM MgCl ₂)

0,2 µl *Taq*-Polymerase (5 U/µl)
 25,8 µl H₂O

Für die PCR wurde folgendes Profil gewählt:

1 Zyklus	95°C	3 min
35 Zyklen	95°C	1 min
	50°C	1 min
	72°C	2 min
1 Zyklus	72°C	10 min

Nach der Restriktion bzw. Insertamplifikation schloß sich eine Auftrennung in 0,8%iger Agarose (1x TAE) an, worauf nach Ausschneiden der entsprechenden DNA-Bande aus dem Gel die Extraktion der DNA aus der Agarose nach einer verbesserten Freeze-Squeeze-Methode (TAUTZ und RENZ 1983) oder mit Hilfe des GeneClean-Kits (Bio101, La Jolla, USA) folgte. Die Insert-DNA wurde in 10 µl TE gelöst.

Restriktion genomischer DNA

Zur Herstellung von Filtern für die SOUTHERN-Hybridisierungen wurden 10 bis 20 µg genomische DNA in einem Volumen von 40 µl mit 5U Restriktionsenzym pro µg verdaut. Als Restriktionsendonukleasen fanden *DraI*, *EcoRI*, *EcoRV* und *HindIII* Verwendung. Die Restriktionsansätze wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und nach Zugabe von 1/10 Vol. Ladungspuffer (50% Glycerin, 0,5 % Bromphenolblau, 1 mM EDTA) ebenfalls über Nacht bei 30 V pro 25 cm Gellänge in 0,8 % Agarose (1x TAE) aufgetrennt.

Southern-Blotting

Nach dem Gellauf erfolgte eine Depurinierung der aufgetrennten DNA in 0,25 M HCl bis die blaugefärbte Ladepuffer-Front einen gelben Farbton annahm. Daran schloß sich eine Inkubation in Denaturierungslösung (1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH) an, bis sich die Front wieder blau färbte. Nach kurzem Spülen mit H₂O wurde das Gel für mindestens 15 min in Neutralisationslösung (1,5 M NaCl; 0,5 M Tris (HCl) pH 7.6) gewaschen. Der Aufbau einer Kapillarblot-Apparatur entsprach der Beschreibung in SAMBROOK *et al.* (1989). Als Membran fand Hybond N⁺ (Amersham) bzw. Porablot NY plus (Macherey-Nagel) Verwendung, als Transferpuffer wurde 6x SSC eingesetzt. Der Transfer fand über Nacht statt, dem die Fixierung der DNA mit 0,4 M NaOH für 5 min und Backen bei 80°C für 2 h folgte. Die Filter wurden nach kurzem Schwenken in 2x SSC bei 4°C gelagert.

Markierung der DNA-Sonden

Die zuvor beschriebene isolierte Insert-DNA wurde durch fünfminütiges Kochen im Wasserbad denaturiert und nach dem Verfahren des „random primed labelling“ (FEINBERG und VOGELSTEIN 1983, 1984) radioaktiv markiert. Die Reaktion ist in einem Volumen von 50 µl wurde ein Kit der Fa. Gibco/BRL durchgeführt worden, das sich wie folgt zusammensetzte:

25-50 ng	denaturierte Insert-DNA
2 µl	dATP
2 µl	dGTP
2 µl	dTTP
15 µl	Random Primers Buffer Mixture
4 µl	[α - ³² P]dCTP (10 µCi/µl)
1 µl	Klenow Fragment

Das Reaktionsgemisch wurde für 1 h bei 37°C inkubiert. Nicht inkorporierte radioaktive Nukleotide sind mittels einer Sephadex G-50-Säule (Microspin-columns, Pharmacia) abgetrennt worden.

Hybridisierung

Die Prähybridisierung und die Hybridisierungsreaktion fanden in Glasröhren statt, die in einem Ofen (Fa. Bachhofer) bei einer Temperatur von 65°C rotierten. Die Röhren wurden mit 1 bis 2 Filtern bestückt und mit 10-20 ml Hybridisierungslösung befüllt. Im Anschluß an eine Prähybridisierung der Filter für 5 h erfolgte nach Zugabe der markierten und denaturierten Sonde die Hybridisierung über Nacht. Im Falle des Sonden-Screenings wurden 3 Sonden auf einen Screen-Filter hybridisiert. Die Zusammensetzung der Hybridisierungslösung folgte dem Protokoll von SHARP *et al.* (1988):

Hybridisierungslösung: 1x HSB
 1x Denhardts III
 500 µg/ml denat. Heringssperma-DNA

5x HSB: 3 M NaCl
 100 mM PIPES
 20 mM EDTA (pH 6.8)

10x Denhardts III: 2 % Gelatine
 2% Ficoll
 2% PVP 400

10% SDS
20 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$

Waschen der Filter

Dieser Arbeitsschritt diente der Entfernung nicht spezifisch gebundener Sonde, der in drei Stufen mit jeweils unterschiedlichen Stringenzbedingungen ausgeführt wurde. Alle Wasch-schritte verliefen bei Hybridisierungstemperatur, wobei die ersten beiden Schritte mindestens 15 min dauerten und die letzte Waschung für 5 min erfolgte. Anschließend wurden Röntgenfilme den Filtern exponiert und zur Signalverstärkung bei -80°C für 3 bis 14 Tage bis zur Entwicklung der Filme aufbewahrt.

Waschpuffer 1: 2x SSC; 0,1 % SDS

Waschpuffer 2: 0,5x SSC; 0,1 % SDS

Waschpuffer 3: 0,2x SSC; 0,1 % SDS

2.2.3 Random Amplified Polymorphic DNAs (RAPDs)

RAPD-Untersuchungen beim Roggen sind bereits von PHILIPP (1992) und SENFT (1996) initiiert worden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Dekamerprimer reevaluiert, die laut SENFT (1996) beim Roggen ein reproduzierbares Amplifikationsmuster erzeugten.

2.2.3.1. Dekamer-Primer

Es wurden für Spaltungsanalysen folgende Dekamerprimer (Operon Technologies) ausgewählt, die nach Vorarbeiten von SENFT (1996) für die RAPD-Analyse beim Roggen geeignet erschienen:

Set A: 2, 8, 10, 11, 13, 14, 15, 18, 19

Set B: 1, 3, 5, 9, 11, 13, 18, 20

Set C: 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 18, 19, 20

Set M: 1, 2, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 15, 16, 18, 19

Set N: 5, 7, 9, 10, 13, 14, 17, 18, 19, 20

Set O: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 13, 14, 16, 18, 19

Set P: alle 20

Set Q: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20

Set R: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20

Set S: 1, 2, 3, 4, 5

Set V: 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10

Set X: 4, 8

Set Y: 3, 5

2.2.3.2 Methodik zur Darstellung von RAPDs

Die durchgeführten Untersuchungen folgten im Wesentlichen dem von WILLIAMS *et al.* (1990) bzw. SENFT (1996) vorgeschlagenen Protokoll. Die Reaktion wurde in einem Volumen von 20 µl durchgeführt:

40 ng	Template-DNA
250 nM	Primer
125 µM	je dNTP (Boehringer-Mannheim)
0,5 U	<i>Taq</i> -Polymerase (Pharmacia)
12,5 mM	Tris (HCl) pH 9.0
62,5 mM	KCl
2,375 mM	MgCl ₂

Das Reaktionsgemisch wurde anschließend mit einem Tropfen Mineralöl (Sigma) überschichtet und folgendem PCR-Regime in einem TC1-Thermocycler (Perkin Elmer) unterzogen:

1 Zyklus	94°C	3 min
45 Zyklen	94°C	1 min
	36°C	1 min
	72°C	2 min

Nach Beendigung der Reaktion wurde dem Gemisch 1/10 Vol. Ladungspuffer hinzugefügt und in einem 1,5 %igen Agarosegel (1x TAE) unter 5 V/cm Gellänge aufgetrennt. Dem Gel wurde zuvor Ethidiumbromid zu einer Endkonzentration von 1 µg/ml hinzupipettiert.

2.2.4. Simple Sequence Repeats (SSRs, Mikrosatelliten)

Die Erzeugung von SSR-Markern beruht auf einer Reihe von Arbeitsschritten, wie sie bei den bereits vorgestellten Markertechniken nicht erforderlich ist. Dazu gehören die Suche nach und Isolierung von SSR-Motiven sowie deren flankierender Bereiche, die Sequenzierung derartiger Klone und die Ableitung von Primerpaaren zur PCR-Amplifikation von locuspezifischen SSRs. Außerdem müssen Auftrennungsbedingungen vorliegen, welche die Unterscheidung eines Unterschieds von mindestens 2 bp zulassen.

2.2.4.1. Erstellung genomischer DNA-Bibliotheken

Plasmid-Bibliotheken

Die Herstellung kompetenter Zellen des *E. coli*-Stammes SURE (Stratagene) erfolgte nach einem Protokoll von HANAHAN (1985). Hierzu wurden 50 ml SOB-Medium mit einigen Kolonien des SURE-Stammes beimpft und bei 37°C und 200 rpm inkubiert bis die Bakterien zu einer OD₅₅₀ von 0,4 bis 0,5 gewachsen waren. Die Bakteriensuspension wurde dann nach 15 min Inkubation auf Eis bei 3000 rpm und 4°C für 15 min zentrifugiert. Nach dem der Überstand vollständig abgegossen worden war, ist das Pellet vorsichtig in 1/3 des ursprünglichen Volumens Puffer RF1 resuspendiert und nochmals 15 min auf Eis gestellt worden. Nach erneuter Zentrifugation, wie oben beschrieben, wurden die Bakterien in 4 ml RF2 gelöst, anschließend in 200 µl-Einheiten in Eppendorfhütchen aliquotiert und kurz in N₂ liqu. gefroren. Die Lagerung der kompetenten Zellen erfolgte bei -80°C.

SOB:	2%	Caseinhydrolysat
	0,5%	Hefe-Extrakt
	10 mM	NaCl
	10 mM	MgCl ₂
	10 mM	MgSO ₄
	2,5 mM	KCl
RF1:	100 mM	RbCl
	50 mM	MnCl ₂ · 4 H ₂ O
	30 mM	K-Acetat (Essigsäure) pH 5.8
	10 mM	CaCl ₂ · 2 H ₂ O
	15 %	Glycerin
RF2:	10 mM	MOPS
	10 mM	RbCl
	75 mM	CaCl ₂ · 2 H ₂ O
	15 %	Glycerin

Als Plasmid diente das pBluescript SK-Phagemid (Stratagene), welches in einer 50 ml-Kultur in LB-Medium vermehrt und in Form einer Minipräparation (QIAGEN) entsprechend den Angaben des Herstellers isoliert wurde. Das Plasmid wurde schließlich durch Restriktion mit dem Enzym *EcoRV* in einem 50 µl-Volumen linearisiert und nach einer Phenol/Chloroform-Aufreinigung (SAMBROOK *et al.* 1989) in einem Volumen von 100 µl dephosphoryliert.

Restriktion (50 µl): 10 µg Plasmid
 5 µl Reaktionspuffer 2 (Gibco/BRL)
 5 µl *EcoRV* (50 U) (Gibco/BRL)
 Inkubation bei 37°C für 1 h

Dephosphorylierung (100 µl): 5 µg Plasmid (linearisiert), 5 pmol 5'-Termini
 10 µl Dephosphorylierungspuffer (Gibco/BRL)
 40 µl CIAP (0,1 U/µl)
 Inkubation bei 50°C für 1 h, 75°C für 10 min

Im Anschluß an die Dephosphorylierungsreaktion erfolgte eine Phenol/Chloroform-Aufreinigung.

Größenselektion. Genomische Roggen-DNA ist mit den zu *EcoRV* kompatiblen Restriktionsenzymen *AluI* und *HaeIII* behandelt worden. Nach Auftrennung in einem 0,8%igen Agarosegel erfolgte eine Größenselektion, indem DNA-Fragmente zwischen 200 bp und 1000 bp an DEAE-Chromatographiepapier gebunden und eluiert wurden (R. SCHMIDT, pers. Mitteilung). Hierzu ist der interessierende Fragmentbereich mit Hilfe eines Skalpell vom Restgel getrennt, und in die Einschnittstellen unterhalb 200 bp und oberhalb 1000 bp ein Stück DE81-Papier (Whatman) inseriert worden. Die Elektrophorese wurde solange fortgeführt, bis der Fragmentbereich vollständig auf das Papier bei 200 bp gelaufen ist. Die am Papier gebundene DNA wurde in einem 0,6 ml PCR-Gefäß, in dessen Boden zuvor etwas Glaswolle gestopft worden ist, in 400 µl HSE-Puffer für 1 h bei 65°C eluiert und nach Durchbohren des Bodens in ein größeres 1,5 ml Eppendorfgefäß zentrifugiert. Die im Eluat enthaltene DNA wurde nach Zugabe von 1 ml EtOH bei -20°C gefällt und nach Waschen und Trocknen in 10 bis 20 µl H₂O resuspendiert.

HSE: 1 M LiCl
 10 mM Tris (HCl) pH 7.5
 1 mM EDTA
 20 % EtOH

Die Ligation der fraktionierten DNA-Fragmente an den linearisierten Vektor erfolgte in einem 10 µl-Volumen, wobei das stöchiometrische Verhältnis entsprechend den Angaben des Herstellers (Gibco/BRL) berücksichtigt wurde:

1 µl pBluescript SK⁺, *EcoRV*, dephosphoryliert (75 ng, ca. 75-100 fmol)
 2 µl *AluI*-restringierte genomische DNA (30-40 ng, ca. 250-300 fmol)
 2 µl 5x DNA Ligase Reaktionspuffer

1 μ l T4 DNA Ligase (1 U)
4 μ l H₂Odd

Die Ligation wurde bei 14°C in einem Wasserbad für 24 h durchgeführt. Die Transformation der kompetenten SURE-Zellen mit den rekombinanten Plasmiden erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers (Stratagene). Nachdem 100 μ l kompetente Zellen auf Eis aufgetaut worden sind, wurden 1,7 μ l einer 1,4 M β -Mercaptoethanol-Lösung zugemischt und nach 10 min auf Eis 2 μ l des Ligationsansatzes dazugegeben. Nach weiteren 30 min auf Eis schloß sich eine Hitzeschockbehandlung bei 42°C für 50 sek an. Nach 2 min auf Eis wurde die Bakteriensuspension mit 900 μ l vorgewärmtem SOC-Medium versetzt und für 1 h bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Zwischen 20 und 100 μ l des Transformationsansatzes wurden anschließend auf Ampicillin-haltige LB-Agarplatten (10 μ g/ml), die zuvor mit 40 μ l IPTG (Stammlösung 20% w/v) und 40 μ l X-Gal (Stammlösung 20 mg/ml Dimethylformamid) behandelt worden sind, ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Aufbewahrung der Platten fand bei 4°C statt.

λ -Bibliotheken

Als Vektor für diese Bibliotheken diente λ ZAP Express (Stratagene), der bereits in Form von *Bam*HI vorgeschrittenen und mit CIAP dephosphorylierten λ -Armen geliefert wurde. Somit mußte lediglich genomische DNA des Roggens mit kompatiblen Restriktionsenzymen verdaut und anschließend ligiert werden. Die Restriktion der genomischen DNA erfolgte in zwei Varianten:

a) Restriktion mit *Mbo*I

100 μ l-Ansatz: 20 μ l Roggenchromatin (ca. 10 μ g)
60 μ l H₂Odd
10 μ l 10x Reaktionspuffer 2 (Gibco BRL)
10 μ l *Mbo*I (100 U; Gibco BRL)

b) Vorverdau mit *Pst*I; anschließend Restriktion der Fragmente einer Größe bis 10 kb mit *Sau*3AI:

100 μ l-Ansatz: 50 μ l genomische DNA (25 μ g)
30 μ l H₂Odd
10 μ l 10x Reaktionspuffer 2 (Gibco BRL)
10 μ l *Pst*I (100 U; Gibco BRL)
Inkubation bei 37°C; 3 h

Die Fraktion < 10 kB wurde mit der DEAE-Papiermethode wie oben beschrieben isoliert und mit *Sau3AI* restringiert:

100 µl-Ansatz: 40 µl *PstI*-restringierte genomische DNA (1-10 kB)
 40 µl H₂Odd
 10 µl 10x Reaktionspuffer 4 (Gibco BRL)
 10 µl *Sau3AI* (100 U; Gibco BRL)
 Inkubation bei 37°C; mindestens 1 h

DNA-Fragmente zwischen 200 und 1000 bp sind erneut mittels DEAE-Papier isoliert und in 10 µl H₂Odd aufgenommen worden.

Ligation. Vor der Ligation wurden die λZAP-*Bam*HI-Arme bei 11000 xg kurz zentrifugiert, gemischt und in 1 µl (1 µg) aliquotiert. Die Ligation wurde in einem 5 µl-Volumen durchgeführt. Die Reaktion fand über 2 Tage bei 4°C statt.

Variante 1: 1 µl λZAP Express/*Bam*HI/CIAP (1 µg; Stratagene)
 1 µl *MboI*-restringierte genomische DNA (ca. 10 ng)
 0,5 µl 10x Ligasepuffer (Stratagene)
 0,5 µl 10 mM rATP pH 7.5 (Stratagene)
 1,5 µl H₂Odd
 0,5 µl T4-DNA Ligase (1U; Stratagene)

Variante 2: 1 µl λZAP Express/*Bam*HI/CIAP (1 µg; Stratagene)
 2 µl gröbenselektierte *PstI/Sau3AI*-restringierte genomische DNA
 (ca. 40 ng)
 0,5 µl 10x Ligasepuffer (Stratagene)
 0,5 µl 10 mM rATP pH 7.5 (Stratagene)
 0,5 µl H₂Odd
 0,5 µl T4-DNA Ligase (1U; Stratagene)

Verpackung. Die Vorgehensweise entsprach dem Protokoll des Herstellers (Gigapack II Packaging extract; Stratagene). Die Verpackungsextrakte wurden zunächst von Trockeneis (CO₂) auf Eis überführt, wobei das gelbe Röhrchen (sonic extract) zuerst aufgetaut wurde. Sobald der Inhalt des roten Röhrchens (freeze-thaw extract) zu tauen begann, wurde zunächst 1 µl der ligierten DNA hinzupipettiert und darauf sofort 15 µl des „sonic extract“ zugegeben und vorsichtig gemischt. Nach einem kurzen Zentrifugationsschritt schloß sich eine zweistündige Inkubation bei 22°C an. Der Verpackungssuspension wurden anschließend 500 µl SM-Puffer hinzupipettiert. Nach Zugabe von 20 µl Chloroform und

kurzem Vortexen ließen sich denaturierte Proteine nach kurzem Zentrifugieren entfernen. Der Überstand wurde bis zur Titerbestimmung bei 4°C aufbewahrt.

SM (1 l): 5,8 g NaCl
 2,0 g MgSO₄ · 7 H₂O
 50 ml 1 M Tris (HCl) pH 7.5
 5 ml Gelatine (2 % w/v)

Titerbestimmung. Für die Transfektion ist der Bakterienstamm XL1 Blue MRF' (Stratagene) verwendet worden. 50 ml LB-Medium, das 0,2 % Maltose und 10 mM MgSO₄ enthielt, wurden mit einer Kolonie des Stammes inokuliert und bei 30°C über Nacht geschüttelt. Am darauffolgenden Tag wurde frisches Medium, wie oben, mit 1/100 Vol. der Kultur beimpft und bei 37°C inkubiert, bis sich die Bakterien in der exponentiellen Wachstumsphase (OD₆₀₀ = 1) befanden. Nach Verdünnung in frischem LB-Medium bis zu einer OD₆₀₀ = 0,5 wurden 200 µl dieser Wirtszellen mit 10 µl verschiedener Verdünnungsstufen (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ und 10⁻⁴) des Verpackungsansatzes versetzt. Als Verdünnungsmittel diente SM-Puffer. Die Inkubation bei 37°C unter Schütteln dauerte 20 min. Die Wirtszellen-Phagen-Lösung wurde nach Zugabe von 48°C warmen Top-Agar (3 ml bei 90 mm Ø-Platten) auf NZY-Agar ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Die Konzentration der Bibliothek (pfu/µl) wurde durch Auszählen der Plaques abgeschätzt.

Top-Agar (1 l): 5 g NaCl
 2 g MgSO₄ · 7 H₂O
 5 g Hefeextrakt
 10 g Caseinhydrolysat
 0,7 % Agarose
 pH 7.5 (NaOH)

NZY-Agar (1 l): 5 g NaCl
 2 g MgSO₄ · 7 H₂O
 5 g Hefeextrakt
 10 g Caseinhydrolysat
 15 g Agar
 pH 7.5 (NaOH)

Für das Ausplattieren des gesamten Verpackungsansatzes sind 600 µl Wirtszellen (OD₆₀₀ = 0,5) und 7 ml Top-Agar eingesetzt worden, wobei etwa 20000 pfu pro 120 mm × 120 mm-Platte ausplattiert wurden. Vor der Abnahme von Plaque-Lifts sind die NZY-Agarplatten mindestens 2 h bei 4°C kühlgestellt worden.

2.2.4.2. Sichtung der Bibliotheken mit synthetischen Oligonukleotiden

Synthetische Oligonukleotide

Die Sichtung der erstellten genomischen Bibliotheken wurde mit zwei, 20 bp langen Oligo-nukleotiden vorgenommen, die aus folgenden 2 SSR-Motiven aufgebaut waren:

1. CTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
2. GTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT

Die lyophilisierten Oligonukleotide (Pharmacia) wurden in H₂Odd gelöst und auf 5 μ M verdünnt.

Herstellung von Plaque-Lifts und Koloniefiltern

Auf eine mit Plaques bewachsenen NZY-Agarplatte wurde eine auf Plattengröße zurechtgeschnittene Hybond N⁺-Membran (Amersham) für 1 min, im Fall eines Replika-Filters für 3-4 min aufgelegt, wieder abgenommen und kurz getrocknet. Die Phagen-DNA auf dem Filter ist anschließend auf mit Denaturierungslösung (s. Kapitel 2.2.2.2.) gesättigtem Whatmanpapier (5 min) einzelsträngig gemacht und nachfolgend für die gleiche Dauer mit Neutralisationslösung (s. Kapitel 2.2.2.2.) benetzt worden. Nach fünfminütiger Behandlung mit 2x SSC wurden die Filter getrocknet und die DNA mittels 0,4 M NaOH für 10 min fixiert. Nach erneutem Waschen in 2x SSC konnten die Filter für die Hybridisierung verwendet werden.

Die Herstellung von Koloniefiltern erfolgte nach dem Ausstreichen von Bakterienkolonien auf Ampicillin-haltigen LB-Agarplatten auf ähnliche Weise. Die aus der ersten Sichtung hervorgehenden positiven Klone wurden durch Ausstrich in einem geordneten Muster nochmals überprüft.

Endmarkierung

Die Reaktion beruht auf einer Markierung des 5'-Endes des Oligonukleotids mit γ -³²ATP. Aufgrund ähnlicher Schmelztemperaturen (T_m) sind die beiden Oligonukleotide zusammen in einem Ansatz markiert worden.

- Endmarkierung (10 μ l):
- | | |
|-----------|--|
| 1 μ l | je Oligonukleotid (5 pmol) |
| 3 μ l | H ₂ Odd |
| 1 μ l | 10x Forward Exchange-Puffer (Promega) |
| 3 μ l | [γ - ³² P]ATP (10 μ Ci/ μ l; ICN) |
| 1 μ l | T4-Polynukleotidkinase (8-10 U; Promega) |

Nach einer Inkubation bei 37°C für 10 min wurde die Reaktion mit 1 µl 0,5 M EDTA gestoppt. Die Entfernung nichtgekoppelter radioaktiver ATPs geschah mittels G25-Sephadex-Säulen (NAP 5 columns; Pharmacia) entsprechend den Angaben des Herstellers. Als Equilibrierungs- und Elutionspuffer diente eine 10 mM Natriumphosphat-Lösung (5 mM Na₂HPO₄ · 12 H₂O; 5 mM NaH₂PO₄ · H₂O; pH 6.8).

Hybridisierung und Waschen

Die Hybridisierung wurde mit 4 Plaque-Filtern mit je 90 mm Ø bzw. mit 2 Filtern der Größe 120 mm × 120 mm pro Hybridisierungsröhre (Bachhofer) durchgeführt. Das Hybridisierungsvolumen betrug 10-15 ml pro Röhre, wobei die Filter vor der Zugabe der markierten Oligonukleotid-Sonden für mindestens 2 h prähybridisiert worden waren.

Hybridisierungslösung: 0,5 M Natriumphosphat-Puffer (0,25 M Na₂HPO₄ · 12 H₂O; 0,25 M NaH₂PO₄ · H₂O) pH 7.2
 7 % SDS
 1 % BSA (Sigma)
 1 % Trockenmilchpulver
 1 mM EDTA

Der T_m-Wert der Oligonukleotide wurde nach einer Formel entsprechend SAMBROOK *et al.* (1989) ermittelt:

$$T_m(^{\circ}\text{C}) = 81,5 + 16,6 (\log_{10} [\text{Na}^+]) + 0,41(\% \text{ GC}) - (600/N)$$

[Na⁺] = Molarität monovalenter Kationen (Na⁺-Konzentration; gültig von 0,01 bis 0,40 M)

%GC = Prozentgehalt an G- und C-Nukleotiden im Oligonukleotid (gültig für 30-75 %)

N = Länge des Oligonukleotids (in Basen)

Der T_m-Wert bezieht sich auf die Bedingungen des letzten stringenten Waschschrittes. In der Waschlösung liegt [Na⁺] zwischen 0,39 M und 0,40 M. Bei 50 %GC und einer Kettenlänge von 20 Basen ergibt sich für beide Oligonukleotide ein T_m-Wert von 64,9°C.

Die Hybridisierung erfolgte über Nacht oder für mindestens 3 h bei 60°C (T_m - 5°C). Die Filter wurden zweimal bei Hybridisierungstemperatur in 2x SSC; 1 % SDS für 15 min gewaschen und darauf ein Röntgenfilm über Nacht bei -80°C exponiert.

Isolierung von positiven Klonen

Plaques, die bei der ersten Sichtung ein positives Signal auf dem Film ergaben, wurden mit der oberen Öffnung einer 200 µl-Pipettenspitze gepickt und in 500 µl SM-Puffer überführt. Nach Zugabe von 20 µl Chloroform und kurzem Vortexen sind die Plaques bis zu einer weiteren Überprüfung bei 4°C aufbewahrt worden. Die Durchführung einer zweiten Selektion der als positiv bewerteten Klone erfolgte auf 90 mm Ø-NZY-Agarplatten bei einer Dichte von 50 bis 200 isolierten Plaques. Deutlich isolierte Plaques, die wiederum ein positives Signal erzeugten, wurden mittels einer 5 ml-Pipettenspitze isoliert und in 500 µl SM + 20 µl Chloroform gelagert. Solche reine Phagenklone wurden anschließend einer *in vivo*-Exzision unterworfen. Wenn erforderlich schloß sich ein weitere Überprüfung an.

2.2.4.3. *in vivo*-Exzision

Der λZAP Express-Vektor erlaubt mit Hilfe dieses Verfahrens die Umwandlung rekombinanter Phagen in rekombinante Bakterien mit den entsprechenden Phagemiden (Plasmiden). Dazu wird neben einem Helferphagen (ExAssist; Stratagene) ein phagenresistenter Bakterienstamm (XL0LR; Stratagene) benötigt. Die Effizienz der *in vivo*-Exzision wird in erster Linie vom Titer des Helferphagen und des rekombinanten Phagen bestimmt. Deshalb wurde der primäre Phagentiter durch Amplifikation („High Titer Stock“; SAMBROOK *et al.* 1989) so stark erhöht, daß eine erfolgreiche *in vivo*-Exzision in allen Fällen gewährleistet war.

High Titer Stock. 500 µl einer Übernachtskultur des Stammes XL1Blue MRF' (s. Kapitel 2.2.4.1) wurden in 50 ml LB + 10 mM MgSO₄ + 0,2 % Maltose verdünnt. Nachdem die Wirtszellen bis zu einer OD₆₀₀ = 1,0 gewachsen waren, wurden davon 200 µl mit 50 µl Phagensuspension inokuliert und bei 37°C für 20 min leicht geschüttelt. Nach dem Ausplattieren mit 3 ml Top-Agar auf 90 mm Ø NZY-Agarplatten sind diese über Nacht bei 37°C inkubiert worden. In der Regel war in diesem Zeitraum der Bakterienrasen von den Plaques zu einer netzartigen Struktur abgebaut und damit ein hohe Plaquedichte erreicht worden. Die Platten wurden am darauffolgenden Tag auf 4°C abgekühlt, mit 3 ml SM-Puffer überschichtet und auf einem Rundschüttler mehrere Stunden bewegt. Etwa 2 ml des abgeschwemmten SM-Puffers sind mit 40 µl Chloroform versetzt, gevortext und für 10 min bei 4000 xg zentrifugiert worden. 1,5 ml des Überstandes wurden in ein neues Gefäß überführt und nach Zugabe von 20 µl Chloroform bei 4°C gelagert.

Für die *in vivo*-Exzision konnte die für die Erzeugung des „High Titer Stocks“ benötigte XL1Blue MRF'-Kultur (OD₆₀₀ = 1,0) genutzt werden. Daneben wurde eine Übernachtskultur des Stammes XL0LR hergestellt, die am nächsten Tag im Verhältnis 1/100 in 50 ml LB verdünnt wurde und die ebenfalls bis zu einer OD₆₀₀ = 1,0 wuchs. In dieser Zeit wurden

200 µl XL1Blue MRF', 250 µl des High Titer Stocks und 2 bis 5 µl des ExAssist-Helferphagen (ca. 10^6 pfu/µl) in ein 50 ml-FALCON-Röhrchen pipettiert und für 3-4 h bei 37°C geschüttelt, wobei nach 15 min 3 ml LB hinzugegeben worden sind. Die Kotransfektion bewirkt die Einzelstrang-Synthese und Rezirkularisation einer im λ -Vektor enthaltenen Sequenz zu einem Phagemid (pBK-CMV; Stratagene), das anschließend als filamentöser Phage verpackt wird. Eine 15-minütige Behandlung bei 70°C führte zur Abtötung der Bakterien, während die Phagemid-Partikel intakt blieben. Nach Überführung der Suspension in Eppendorfhütchen und einer Zentrifugation bei 4000 xg wurden vom Phagemid-Überstand 10 µl bzw. 100 µl abgenommen und mit 200 µl XLOLR-Zellen bei 37°C für 15 min inkubiert. Nach Zugabe von 300 µl LB wurde die Kultur weitere 45 min bei 37°C geschüttelt. Danach wurden von jedem Klon 20 µl bzw. 100 µl auf Kanamycin-haltige Platten (50 µg/ml) einschließlich IPTG und X-Gal (s. Kapitel 2.2.4.1) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Jeweils vier Kolonien eines Klons wurden in je 4 ml LB + Kanamycin (50 µg/ml) angeimpft, woran sich eine Plasmid-Präparation mit Hilfe des QIAprepSpin-Kits (s. Kapitel 2.2.2.1) anschloß. Es fand nochmals eine Überprüfung auf Anwesenheit einer SSR-Sequenz statt, indem 1 µg eines jeden Plasmids mittels einer Dot Blot-Apparatur (Gibco BRL) auf Nylonmembran übertragen und mit radioaktiv markiertem (CT)₁₀ und (GT)₁₀ hybridisiert worden sind. Erst nach erneuter positiver Antwort wurden die Plasmide für die Sequenzierung vorbereitet.

2.2.4.4 Sequenzierung

Manuelle Sequenzierung. Die Sequenzierung der Plasmide erfolgte nach der Didesoxynukleotid-Abbruchmethode mit einem Protokoll, das mit dem direkten Einbau von radioaktivem dATP arbeitete. Mittels des „Cycle Sequencing“-Verfahrens, das sich der PCR bedient, konnten geringere Plasmidmengen eingesetzt werden als dies bei der Verwendung von T7-DNA-Polymerase der Fall ist. Die Sequenzierung wurde mit dem „*fmol*-DNA Sequencing System“ (Promega) durchgeführt und bestand aus 4 Reaktionen, d.h. für jede Base wurde eine Reaktion angesetzt:

Sequenzierreaktion für 1 Base (6 µl): 2,0 µl dATP/ddATP oder dCTP/ddCTP oder
dGTP/ddGTP oder dTTP/ddTTP
4,0 µl Mastermix

Mastermix für 4 Reaktionen (17 µl): 0,5-1 µg Template-DNA
0,6 µl Primer (3 pmol)
5,0 µl *fmol* Sequencing 5x Puffer
1,0 µl *Taq*-Polymerase (5 U; Promega)
0,5 µl [α -³³P]dATP (10 µCi/µl)

Als Primer dienten die T3-Promotor- und T7-Polymerasesequenzen, die sowohl in pBluescript SK⁻ als auch pBK CMV enthalten sind. Der Inhalt eines PCR-Gefäßes wurde mit einem Tropfen Mineralöl (Sigma) überschichtet und folgendem PCR-Regime unterworfen:

1 Zyklus	2 min	95°C
30 Zyklen	30 sek	95°C
	30 sek	42°C
	1 min	70°C

Nach Ende des Programms sind die Reaktionen mit je 3 µl DNA Sequencing Stop Solution (10 mM NaOH; 95% Formamid; 0,05% Bromphenolblau; 0,05% Xylencyanol) abgebrochen, die Proben vor der Auftrennung für mindestens 2 min bei 70°C erhitzt und auf Eis gestellt worden. Von jeder Probe wurden 3-4 µl auf ein denaturierendes Polyacrylamid-Gel in einem SA60-Sequenziersystem (Gibco BRL) aufgetragen.

Lösung für Sequenziergel (60 ml):	25,2 g	Harnstoff (Sigma)
	7,2 ml	10x TBE
	6 ml	Long Ranger (Serva)
	30 µl	TEMED (Sigma)
	300 µl	10% APS

Das Gel wurde über Nacht auspolymerisiert und tags darauf in die Apparatur eingespannt. Die Elektrophorese verlief bei 60 W und 2700 V und wurde solange durchgeführt, bis die grüne Lauffront etwa 2/3 der Gellänge (60 cm) erreichte. Nach dem Aufziehen des Gels auf WHATMAN-Chromatographiepapier wurde es für 1-2 h bei 70°C auf einem Geltdrockner (OWL) unter Vakuum (Uniequip) getrocknet und ein Röntgenfilm (Biomax MR-1, Kodak) über Nacht aufgelegt.

Automatische Sequenzierung. Wegen der großen Zahl der zu analysierender Klone sind weitere Sequenzierungen aus Zeit- und Kostengründen in Auftrag gegeben worden (LAROVA GmbH, Teltow). Die Sequenzierung erfolgte dort an einem 4000S Automated DNA Sequencing System (LI-COR) mit Infrarot-Lasertechnologie ebenfalls nach der Methode des Cycle Sequencing, aber mit ThermoSequenase (Amersham). Die Ergebnisse der Sequenzierungen wurden in Form des „standard chromatogram file“-Formats (SCF) übermittelt.

2.2.4.5 Konstruktion von Primerpaaren

Aus den beiden flankierenden Bereichen einer SSR-Sequenz ließen sich mit Hilfe des Primeranalyse-Programms OLIGO 4.0 (RYCHLIK und RHOADS 1989) ein oder mehrere

geeignete Primerpaare erstellen. Hierbei wurden lediglich Oligonukleotide einer Größe zwischen 18 und 26 bp zugelassen und auf Primerpaar-Kompatibilität getestet. Es wurde darauf geachtet, daß insbesondere am 3'-Ende keine Dimerbildung mit dem anderen Primer als auch keine Selbstkomplementarität auftrat. Die Anzahl der maximalen Basenpaarungen eines Primers mit sich selbst und mit dem zweiten Primer wurde auf 1/3 der Länge des Oligonukleotids begrenzt. Der GC-Gehalt eines Primers sollte größer als 30% und kleiner als 70% sein. Haarnadelstrukturen mit einer freien Energie $\Delta G > 0$ kcal/mol wurden nur am 5'-Ende erlaubt. Die freie Energie eines Primers lag zwischen -38 und -42 kcal/mol. Als weitere Kriterien sind die Schmelztemperaturen (T_m) eines Primerpaars und die Länge des zu erwartenden PCR-Produkts von Bedeutung. Die T_m -Werte nach der „nearest neighbor“-Methode eines Primers durften zwischen 60 und 65°C liegen, was etwa einem T_m -Wert nach der „%GC“-Methode zwischen 65 und 70°C entsprach. Der zulässige Unterschied der Schmelztemperaturen der Primer eines Primerpaars betrug 2°C. Die Länge der zu erwartenden PCR-Produkte beschränkte sich auf eine Untergrenze von 90 bp und eine Obergrenze von 300 bp. Die Primer sind in einem Maßstab von 10 bzw. 50 nmol von der Firma MWG-Biotech GmbH (Ebersberg) synthetisiert und in 1 ml H₂O gelöst worden. Außerdem wurden SSR-Primerpaare des Weizens (WMS) untersucht, die auch zu einer Amplifikation von spezifischen DNA-Regionen des Roggens führten (RÖDER *et al.* 1995).

2.2.4.6 PCR-Bedingungen

Die Reaktionsgemisch setzte sich ähnlich zusammen wie in RÖDER *et al.* (1995) beim Weizen beschrieben. Es wurde allerdings ein 20 µl-Reaktionsvolumen bei nichtradioaktiver Detektion und ein 10 µl-Volumen bei radioaktiver Detektion angesetzt.

Nichtradioaktiv:	50-100 ng	Template-DNA
	250 nM	je Primer
	200 µM	je dNTP (Boehringer Mannheim)
	50 mM	KCl
	10 mM	Tris (HCl) pH 9.0
	1,5 mM	MgCl ₂ (2,5 mM für WMS-Primer)
	0,5 U	<i>Taq</i> -Polymerase (Pharmacia bzw. Perkin Elmer)

Radioaktiv:	50 ng	Template-DNA
	250 nM	$\gamma^{33}\text{P}$ -endmarkierter Primer A
	250 nM	Primer B
	200 µM	je dNTP
	50 mM	KCl

10 mM	Tris (HCl) pH 9.0
1,5 mM	MgCl ₂ (2,5 mM für WMS-Primer)
0,5 U	<i>Taq</i> -Polymerase (Pharmacia bzw. Perkin Elmer)

Endmarkierung:	20 pmol	Primer A
	1x	Forward-Reaktionspuffer (Promega)
	30 pmol	$\gamma^{33}\text{P}$ -[ATP] (ICN; 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$)
	8-10 U	T4-Polynukleotidkinase (Promega)
	30 min bei 37°C; 10 min 70°C	

In Abhängigkeit von der verwendeten *Taq*-Polymerase wurden zwei verschiedene PCR-Profile gewählt. Mit dem Enzym der Firma Pharmacia ist folgendes Standardprofil erstellt worden:

1 Zyklus	94°C	3 min	
40 Zyklen	94°C	1 min	
	60°C	1 min	(in wenigen Fällen 50°C bzw. 55°C)
	72°C	30 sek	
1 Zyklus	72°C	10 min	

Das Enzym AmpliTaq Gold (Perkin Elmer) erlaubt hingegen eine „Hot Start“-PCR, indem es erst nach 8 min bei 93°C graduell aktiviert wird. Diese *Taq*-Polymerase wurde dann eingesetzt, wenn mit dem Standardprotokoll zusätzliche unspezifische Banden auftraten.

1 Zyklus	93°C	9 min	
40 Zyklen	95°C	1 min	
	60°C	1 min	bzw. 55°C 1 min
			60°C 30 sek
1 Zyklus	60°C	10 min	

2.2.4.7 Elektrophoresebedingungen und Detektion

Die Reaktionen wurden anschließend im Fall einer nichtradioaktiven Analyse mit 1/10 Vol. Ladungspuffer, im Fall der radioaktiven Analyse mit 1 Vol. Stop-Puffer (10 mM EDTA; 98 % Formamid; 0,05 % Bromphenolblau; 0,05 % Xylencyanol) versetzt. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in der Regel auf 3,5% Metaphor-Gelen (FMC Bioproducts) in 1x TBE mit 5,5 V pro cm Gellänge. Neben den Proben wurde als Größenmarker 1 μg *Msp*I-restringiertes Plasmid pBR322 (New England Biolabs) aufgetragen. Die PCR-Produkte sind über einem Transilluminator sichtbar gemacht und Abbilder der Gele mittels einer Videodokumentationsanlage festgehalten worden.

Mit Metaphor-Agarose kann eine sichtbare Auflösung von 4 bp Unterschied erreicht werden. In Fällen, in denen diese Auflösung nicht ausreichend war, mußten die radioaktiv markierten Amplifikate auf einem 6 %igen denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt werden. Hierfür wurde eine bereits gebrauchsfertige Gellösung der Firma National Diagnostics (Biozym) verwendet. Sie setzte sich aus 1x TBE; 5,7 % (w/v) Acrylamid; 0,3 % Methylen-Bisacrylamid; 8,3 M Harnstoff; 0,08 % APS zusammen. Die Vorgehensweise bei der Elektrophorese ist bereits in 2.2.4.4 beschrieben worden. Als Größenmarker diente die Sequenz des Plasmids pBluescript SK⁻ (Stratagene). Der Film konnte bereits nach wenigen Stunden Exposition entwickelt werden.

2.2.5. Amplifikationsfragment-Längenpolymorphismen (AFLPs)

Zum Nachweis von AFLPs in der Kartierungspopulation diente der „AFLP Starter Primer Kit“ (Gibco BRL) in Verbindung mit dem „AFLP™ Analysis System I“. Das Protokoll ist dahingehend modifiziert worden, daß die Analyse einer größeren Anzahl von Einzelpflanzen bei gleichem Kostenaufwand realisiert werden konnte. Das geschah durch Reduzierung des Reaktionsvolumens in allen Teilschritten des Protokolls.

2.2.5.1 Primerkombinationen

Aus einer Anzahl von 64 angebotenen *EcoRI*/*MseI*-Primerkombinationen sind 18 Kombinationen ausgewählt worden, die sich für Gerste als geeignet erwiesen (Tabelle 2.2). Die *MseI*- und *EcoRI*-Adapter und -Universalprimer sind folgendermaßen aufgebaut (VOS *et al.* 1995):

MseI-Adapter: 5´-GACGATGAGTCCTGAG-3´
3´-TACTCAGGACTCAT-5´

MseI-Universalprimer (M00): 5´-GATGAGTCCTGAGTAA-3´

EcoRI-Adapter: 5´-CTCGTAGACTGCGTACC-3´
3´-CTGACGCATGGTTAA-5´

EcoRI-Universalprimer (E00): 5´-GACTGCGTACCAATTC-3´

Tabelle 2.2: Untersuchte AFLP-Primerkombinationen und deren Primersequenzen

Primerkombination	<i>EcoRI</i>-Primer (5'→3')	<i>MseI</i>-Primer (5'→3')
E32M47	E00 + AAC	M00 + CAA
E32M49	E00 + AAC	M00 + CAG
E33M47	E00 + AAG	M00 + CAA
E33M48	E00 + AAG	M00 + CAC
E33M59	E00 + AAG	M00 + CTA
E33M60	E00 + AAG	M00 + CTC
E33M61	E00 + AAG	M00 + CTG
E33M62	E00 + AAG	M00 + CTT
E36M48	E00 + ACC	M00 + CAC
E36M49	E00 + ACC	M00 + CAG
E36M59	E00 + ACC	M00 + CTA
E36M60	E00 + ACC	M00 + CTC
E36M61	E00 + ACC	M00 + CTG
E36M62	E00 + ACC	M00 + CTT
E37M47	E00 + ACG	M00 + CAA
E37M48	E00 + ACG	M00 + CAC
E37M49	E00 + ACG	M00 + CAG
E37M50	E00 + ACG	M00 + CAT

2.2.5.2 Restriktion und Ligation

Die Restriktion und die Adapterligation wurden nicht wie Originalprotokoll angegeben in einem 25 µl- bzw. 50 µl-Volumen, sondern in 10 µl bzw. 20 µl durchgeführt.

Restriktion:	250 ng	Template DNA
	10 mM	Tris (HCl) pH 7.5
	10 mM	Mg-Acetat
	50 mM	K-Acetat

1 U *EcoRI* (1,25 U/μl; Gibco BRL)
 1 U *MseI* (1,25 U/μl; Gibco BRL)

Das Reaktionsgemisch wurde mindestens 2 h bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung der Restriktionsenzyme fand anschließend bei 70°C für 15 min statt.

Adapterligation: 10 μl Restriktionsansatz
 9,6 μl Adapter/Ligations-Lösung (Gibco BRL)
 0,4 μl T4-DNA-Ligase (0,4 U; Gibco BRL)

Die Ligation erfolgte bei Raumtemperatur, die Dauer betrug mindestens 2 h. Anschließend wurde eine 1:10-Verdünnung vorgenommen, indem 10 μl des Reaktionsgemisches 90 μl TE zugesetzt worden sind. 1 μl wurde für die Präamplifikation benötigt, der Rest ist bei -20°C aufbewahrt worden.

2.2.5.3 Präselektive und selektive Amplifikation

Präselektive Amplifikation. Für die Präamplifikationsreaktionen konnte das im Originalprotokoll angegebene Volumen von 51 μl auf 10,2 μl reduziert werden:

1 μl Template-DNA (Verdünnung des Ligationsansatzes)
 8 μl Pre-Amp Primer-Mix (Gibco BRL)
 1 μl 10x PCR-Puffer für AFLP (Gibco BRL)
 0,2 μl *Taq*-Polymerase (1 U; Pharmacia)

Das Gemisch wurde mit 1 Tropfen Mineralöl überschichtet und folgendem PCR-Programm unterworfen:

20 Zyklen 94°C 30 sek
 56°C 1 min
 72°C 1 min

Nach Ablauf des Programms sind 2 μl abgenommen und mit 98 μl TE gemischt worden (1:50-Verdünnung). Diese Menge war ausreichend für 40 selektive Amplifikationen. Die verdünnten Reaktionsgemische wurden bei 4°C gelagert, die unverdünnten bei -20°C. Für den Nachweis der PCR-Produkte nach der selektiven Amplifikation ist eine Endmarkierung des *EcoRI*-Primers erforderlich. Das Volumen der Endmarkierung betrug 13 μl für einen Reaktionsansatz mit 50 Pflanzen.

Endmarkierung (50 Reaktionen): 4,7 µl *Eco*RI-Primer
 2,6 µl 5x Kinase-Puffer
 2,6 µl H₂Odd
 2,6 µl [γ^{33} P]-ATP (10 µCi/µl; ICN)
 0,5 µl T4-Polynukleotid-Kinase (5 U; GibcoBRL)

Die Reaktion verlief bei 37°C für 1h. Die Kinase wurde anschließend bei 70°C für 10 min inaktiviert. Die Markierungsreaktion wurde für „Komponente 1“ benötigt:

Komponente 1 (50 Reaktionen): 13 µl Endmarkierungsreaktion
 117 µl *Mse*I-Primer

Die „Komponente 2“ setzte sich wie folgt zusammen:

Komponente 2 (50 Reaktionen): 206,7 µl H₂Odd
 52 µl 10x PCR-Puffer für AFLP
 1,3 µl *Taq*-Polymerase (6,5 U; Pharmacia)

Die selektive Amplifikation fand in einem Volumen von 10 µl statt.

Selektive Amplifikation (1 Reaktion): 2,5 µl Template-DNA (Verdünnung des
 Präamplifikationsansatzes)
 2,5 µl Komponente 1
 5 µl Komponente 2

Nach Überschichtung des Gemisches mit 1 Tropfen Mineralöl wurde entsprechend des Standardprotokolls folgendes „Touch Down“-PCR-Programm angewendet:

1 Zyklus	94°C 1 min	65°C 1 min	72°C 1 min 30 sek
1 Zyklus	94°C 1 min	64°C 1 min	72°C 1 min 30 sek
1 Zyklus	94°C 1 min	63°C 1 min	72°C 1 min 30 sek
1 Zyklus	94°C 1 min	62°C 1 min	72°C 1 min 30 sek
1 Zyklus	94°C 1 min	61°C 1 min	72°C 1 min 30 sek
1 Zyklus	94°C 1 min	60°C 1 min	72°C 1 min 30 sek
1 Zyklus	94°C 1 min	59°C 1 min	72°C 1 min 30 sek
1 Zyklus	94°C 1 min	58°C 1 min	72°C 1 min 30 sek
1 Zyklus	94°C 1 min	57°C 1 min	72°C 1 min 30 sek
1 Zyklus	94°C 1 min	56°C 1 min	72°C 1 min 30 sek
23 Zyklen	94°C 30 sek	56°C 30 sek	72°C 1 min

Den Proben wurden danach das gleiche Volumen Stop-Puffer (s. Kapitel 2.2.4.7) hinzugefügt. Vor dem Auftragen sind sie, sowie ein radioaktiv markierter Größenmarker (30-330 bp AFLP size marker; Gibco BRL) für 3 min bei 95°C erhitzt worden.

2.2.5.4 Auftrennung und Detektion

Als Auftrennungsmatrix diente ein 6 %iges denaturierendes Polyacrylamidgel. Die Herstellung der Gellösung und die verwendete Apparatur entsprach den Angaben in Kapitel 2.2.4.7 bei der radioaktiven Detektion von SSRs. Als Trennpuffer wurde ebenfalls 1x TBE verwendet. Nach einer Präelektrophorese von 30 min bis 1 h schloß sich die Auftrennung der Amplifikationsprodukte an, die bei 55 W und einer Spannung von 1650 V erfolgte. Nachdem die grüne Lauffront (Xylencyanol) 2/3 der Gellänge erreicht hatte, wurde die Elektrophorese beendet und das Gel getrocknet. Der Film (BIOMAX MR-1, Kodak) konnte in der Regel nach 1 bis 2 Tagen entwickelt werden. Die Größe polymorpher Produkte wurde mit Hilfe des Videodokumentationsprogramms BIO-ID V.96 (Vilber Lourmat) bestimmt, im Bereich > 330 bp wurde eine Extrapolation vorgenommen.

2.3. Datenanalyse

2.3.1. Kopplungskarte

In der Kartierungspopulation spaltende, d.h. polymorphe Marker wurden einer Spaltungs- und Kopplungsanalyse unterzogen. Die Einbindung von Markern aus anderen spaltenden Linien (PHILIPP *et al.* 1994) wurde wie von SENFT (1996) beschrieben vorgenommen.

2.3.1.1 Spaltungsanalysen

Für Marker einer F₂-Population ist im Fall der Dominanz entsprechend den Mendelschen Vererbungsregeln ein 3:1-Verhältnis, im Fall einer kodominanten und intermediären Vererbung ein 1:2:1-Verhältnis zu erwarten. Eine nicht statistisch zufällige Abweichung vom erwarteten Verhältnis kann mit dem χ^2 -Anpassungstest („goodness of fit“) überprüft werden. Die Berechnungen sind mit dem Programm LINKAGE-1 (SUITER *et al.* 1983) durchgeführt worden, wobei ein Signifikanzniveau von $P = 0,05$ als kritisch angesehen wurde. Wenn keine weiteren Parameter zu schätzen sind, steht bei dominant-rezessiver Vererbung nur 1 Freiheitsgrad zur Verfügung, bei Testung eines 1:2:1-Verhältnisses im Falle eines kodominanten oder intermediären Erbganges liegen 2 Freiheitsgrade vor. Das hat zur Konsequenz, daß ein signifikant abweichendes Spaltungsverhältnis eines dominanten Markers keine genetische Interpretation zuläßt. Tritt eine signifikante Abweichung bei kodominanten Markern auf, kann die orthogonale Aufteilung des χ^2 -Wertes zu einer Aussage über die Art der vorliegenden Störung führen (WAGNER 1990).

$$\chi_1^2 = \frac{(Hom1 - Het + Hom2)^2}{n} \quad (1)$$

$$\chi_2^2 = \frac{2(Hom1 - Hom2)^2}{n} \quad (2)$$

$$\chi^2 = \chi_1^2 + \chi_2^2 \quad (3)$$

wobei n die Anzahl der Individuen darstellt. $Hom1$ bezeichnet die erste, $Hom2$ die zweite Homozygotenklasse, Het steht für die Anzahl der heterozygoten Individuen.

Ist der χ^2 -Wert in (2) signifikant, kann auf Gametenselektion geschlossen werden, die meist in einem Elternteil (Kreuzungspartner) wirksam ist. Zeigen hingegen der χ^2 -Wert in (1) oder die χ^2 -Werte in (1) und (2) Signifikanz an, ist eine Zygotenselektion anzunehmen. Als genetische Ursachen für abweichende Spaltungen sind Letal- und Subletalfaktoren, chromosomale Rearrangements sowie beim Roggen auch Selbstinkompatibilitätsloci anzuführen.

2.3.1.2. Kopplungsanalysen und Kartenerstellung

Zweipunktanalysen. Jede paarweise Markerkombination wurde auf Allelassoziation, d.h. Kopplung untersucht. Dies geschah mit Hilfe der Programme LINKAGE-1 und MAPMAKER v3.0 (LANDER *et al.* 1987). Da die Art der Kopplungsphase nicht bekannt war, mußten für jeden Marker beide Kopplungsphasen eingegeben werden. Während LINKAGE-1 als Kriterium einen χ^2 -Homogenitätstest in Form einer Zweizeige-Tafel durchführt, ist beim MAPMAKER-Programm ein kritischer *LOD*-Wert anzugeben, wobei

$$LOD = \log_{10} \frac{p = \hat{p}}{p = 0,5} \quad (\text{MORTON 1955}). \quad (4)$$

Als kritischer Grenzwert für die Zweipunktanalyse ist ein minimaler *LOD*-Wert von 3.0 festgesetzt worden, d.h. daß die Wahrscheinlichkeit für den aus den Daten geschätzten Rekombinationswert \hat{p} mehr als 1000-fach größer ist als bei Annahme einer freien Spaltung ($p = 0,5$). Die Schätzung des Rekombinationswertes erfolgt in beiden Programmen mittels der MAXIMUM-LIKELIHOOD-Methode. LINKAGE-1 gibt zusätzlich die Varianz des Rekombinationswertes an.

Da im Fall der hier untersuchten Kartierungspopulation die chromosomale Lokalisation einiger Marker bekannt war (DEVOS *et al.* 1993b; SENFT 1996), wurde in MAPMAKER für jedes der 7 Roggenchromosomen eine mit mindestens drei Ankermarkern bestückte Gruppe mittels des ``make chromosome``- und ``anchor``-Befehls erstellt, die alle in eine Initialisierungsdatei geschrieben wurden. Danach wurde der für die Zweipunktanalyse

benötigte Befehl ``assign´` hinzugefügt. Für den Ausbau einer Kopplungsgruppe betrachtet MAPMAKER eine Kopplung als „transitiv“. Das bedeutet, daß sich eine Beziehung der voneinander entferntesten Marker einer Kopplungsgruppe indirekt aus den dazwischen liegenden Kopplungsbeziehungen herleiten läßt. Benötigte Informationen über die Zweipunkt-Beziehungen sind über den Befehl ``links´` abgefragt worden.

Drei- und Mehrpunktanalysen. Für jedes Chromosom sind mit dem Befehl ``three point´` die relativen Wahrscheinlichkeiten (log-Likelihood) einer Anordnung in einer Dreierkombination für alle möglichen Tripel geschätzt worden. Aus den wahrscheinlichsten Anordnungen wurde mit Hilfe des ``order´`-Befehls die Markerreihenfolge innerhalb eines Chromosoms bestimmt. Der hierfür kritische LOD-Wert wurde gegebenenfalls auf 2.0 gesetzt, um eine Startreihenfolge mit mindestens 4 Markern zu garantieren. Wenn möglich, sind für diese Reihenfolge nur die informativsten Marker ausgewählt worden. Der weitere Einbau von Markern geschah mittels der ``place´`-Prozedur, wobei die Einordnung zunächst bei einem kritischen LOD-Wert von 3.0 und anschließend von 2.0 erfolgte. Die auf diese Weise gewonnene Anordnung wurde mit dem ``ripple´`-Befehl überprüft und danach einer Mehrpunktanalyse unterzogen, wobei noch nicht integrierte Marker innerhalb eines Chromosoms mit den Befehlen ``try´` und ``compare´` eingefügt worden sind. Einige Teilanordnungen, in denen kleine Kartenabstände vorliegen, konnten dabei aber nicht mit einer ausreichenden log-Likelihood (> 2.0) abgesichert werden. Die Gesamtkarte eines Chromosoms ist mit dem ``map´`-Befehl erzeugt worden. Als Kartierungsfunktion diente hierbei die Kosambi-Funktion.

Verbundene Kopplungskarte. Markerloci, die nicht in der hier verwendeten F_2 -Kartierungspopulation spalteten, aber in anderen Linien (PHILIPP 1992), konnten mit dem Programm JOINMAP 1.4 (STAM 1993) eingebunden werden. Die Berechnungen beschränkten sich auf die Chromosomen 5R und 6R. Für andere Chromosomen lag keine ausreichende Anzahl von Ankermarkern vor. Da es sich bei JOINMAP 1.4 nicht wie im Fall von MAPMAKER um ein interaktives Programm handelt, sind entsprechende Parameter und eventuelle Markeranordnungen im voraus festzulegen. Die kritische Grenze für den Linklod, der dem LOD-Wert für die Zweipunktanalyse entspricht, betrug 2.5, für die Mehrpunktanalyse zur Berechnung der Kopplungskarte wurde ein minimaler Wert von 0.5 verwendet. Als Kriterium für die Güte einer Markerreihenfolge dient ein Ansatz von JENSEN und JORGENSEN (1975) nach der Methode der kleinsten Quadrate, jedoch wird anstatt eines Likelihood-Verhältnisses eine kritische χ^2 -Testgröße errechnet. Die Umrechnung in Kartenabstände erfolgte ebenfalls mit der Kosambi-Funktion.

2.3.2 Untersuchungen zum Polymorphiegrad molekularer Marker

2.3.2.1 Schätzung von Allelhäufigkeiten

Für die Schätzung von Allelfrequenzen p_i ($i = 1, \dots, k$) einer Population, in diesem Fall einer Populationssorte, ist die erforderliche Stichprobengröße N abhängig vom Informationsgehalt und Polymorphiegrad eines Markers. Der Informationsgehalt beruht auf der Eigenschaft, die Markerallele eines Genotyps direkt erkennen zu können. So kann die Präzision einer Schätzung bei dominanten Markern nur durch eine größere Stichprobe ausgeglichen werden. Der Polymorphiegrad eines Markers in einer Population wird durch Mutationsrate und Selektionsdruck beeinflusst. Das Aufdecken seltener Allele, d.h. Allele mit einer Häufigkeit $< 5\%$ (HARTL und CLARK 1989), kann ebenfalls nur durch Anhebung der Stichprobengröße kompensiert werden. Einen Ansatz zur Schätzung von Allelhäufigkeiten bietet die MAXIMUM-LIKELIHOOD-Methode (ML). Der zu schätzende Parameter p (5) wird so ermittelt, daß die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten der beobachteten Werte am größten ist. Er ergibt sich aus der Maximierung der logarithmischen Form der Likelihood-Funktion L (6):

$$\frac{d(\log L)}{dp} = 0 \quad (5)$$

$$L(p_1, \dots, p_k) = K \prod_{n=1}^k \prod_{m=n}^k e_{nm}^{N_{nm}} \quad (6)$$

L beschreibt eine Multinomialverteilung einer Zufallsvariablen e_{nm} , bei der es sich um die theoretisch zu erwartende relative Häufigkeit eines Genotypen A_{nm} in einer Stichprobe handelt und für welchen N_{nm} Beobachtungen gemacht wurden. K steht für eine Konstante. Es ist darauf hinzuweisen, daß dieses Wahrscheinlichkeitsmodell folgende Bedingungen voraussetzt:

1. Panmixie
2. Hardy-Weinberg-Gleichgewicht
3. Unendliche Populationsgröße
4. Alle Genotypen haben gleiche Fitness

Diese Prämissen dürfen für die untersuchten Populationssorten als annähernd erfüllt gelten. Bei k Allelen gibt es $k(k+1)/2$ mögliche Genotypen. Jedoch können bei den unterschiedlichen Markerklassen nicht alle Genotypen erkannt werden.

Für RAPDs, AFLPs (und in sehr wenigen Fällen auch RFLPs und SSRs) als biallele Systeme lassen sich nur zwei Klassen beobachten. Dann vereinfacht sich das Modell zu einer Binomialverteilung (7), wobei N_{22} die Anzahl der rezessiven Individuen (Individuen

mit keiner Bande) bezeichnet. Der ML-Schätzwert für das dominante Markerallel p (8) und die dazugehörige Varianz $V(\hat{p})$ (9) sind:

$$L(p) = \frac{N!}{N_{22}!(N - N_{22})!} (1 - (1 - p)^2)^{N - N_{22}} ((1 - p)^2)^{N_{22}} \quad (7)$$

$$\hat{p} = 1 - \sqrt{\frac{N_{22}}{N}} \quad (8)$$

$$V(\hat{p}) = \frac{2p - p^2}{4N} \quad (9)$$

Im Fall zweier Allele mit vollständiger Klassifikation, beispielsweise bei einem kodominanten RFLP, sind alle 3 Genotypen phänotypisch unterscheidbar, und (6) wird zu

$$L(p) = \frac{N!}{N_{11}!N_{12}!N_{22}} p^{2N_{11}} 2p(1 - p)^{N_{12}} (1 - p)^{2N_{22}}. \quad (10)$$

Die Lösung für \hat{p} und $V(\hat{p})$ dieses Gleichungssystems ist:

$$\hat{p} = \frac{2N_{11} + N_{12}}{2N} \quad (11) \quad \text{und}$$

$$V(\hat{p}) = \frac{p(1 - p)}{2N} \quad (12).$$

Allgemein gilt für k Allele, daß die Größe des zu schätzenden Parameters p_i der relativen Häufigkeit des Allels in der Population entspricht:

$$\hat{p}_i = \frac{2N_{ii} + \sum_{j=1}^{i-1} N_{ji} + \sum_{j=i+1}^k N_{ij}}{2N}, \quad (13)$$

wobei N_{ii} die Anzahl der Homozygoten und N bzw. N_{ij} die Gesamtzahl bzw. die Anzahl der Heterozygoten darstellen. Der Fall multipler Allelie ist bei SSR-Markern und auch RFLPs zu beobachten.

Für $k > 2$ Allele ist die Varianz durch die Varianz-Kovarianz-Matrix \mathbf{C} zu ersetzen, da mindestens 2 Varianzen (σ_1^2 und σ_2^2) unabhängig zu schätzen und deren Kovarianz $\sigma_1\sigma_2$ zu berücksichtigen ist. Diese hat bei Vorliegen von 3 Allelen die Form:

$$\mathbf{C} = \begin{pmatrix} p_1(1 - p_1) / 2N & -p_1p_2 / 2N \\ -p_1p_2 / 2N & p_2(1 - p_2) / 2N \end{pmatrix}. \quad (14)$$

Die Darstellung von (14) erfolgt in Form einer Ellipsengleichung (BIEBLER und JÄGER 1987). Die allgemeine Form von (14) lautet

$$\mathbf{C} = \begin{cases} p_i(1-p_i)/2N & \text{für } i = j \\ -p_i p_j / 2N & \text{für } i \neq j \end{cases} \quad (15)$$

Da die Darstellungen bei k Allelen $k-1$ Dimensionen besitzen und somit an Komplexität zunehmen, werden lediglich die Varianzen $V(p_i)$ (erste Zeile von (15)) der Schätzwerte angegeben.

2.3.2.2. Maßzahlen für die Variation von Markern

Maßzahlen für die Variation von Genen und Markern werden häufig mit dem Grad an Heterozygotie (H) in einer Population gleichgesetzt (HEDRICK 1985). Diese beträgt in einer Hardy-Weinberg-Population

$$H = 1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 \quad \text{und ist äquivalent mit} \quad H = \sum_{i=1}^k p_i(1-p_i). \quad (16)$$

Unter Verwendung von geschätzten Allelhäufigkeiten wird (16) zu

$$\hat{H} = 1 - \sum_{i=1}^k \hat{p}_i^2. \quad (17)$$

Die empirische Varianz dieses Ausdrucks ist nach NEI und ROYCHOUDHURY (1974)

$$V(\hat{H}) = \frac{2N-1}{N^3} [(3-2N)(\sum \hat{p}_i^2)^2 + 2(N-2)\sum \hat{p}_i^3 + \sum \hat{p}_i^2]. \quad (18)$$

Eine modifizierte Form von (20) wird von BOTSTEIN *et al.* (1980) als sogenannter *PIC*-Wert (**p**olymorphic **i**nformation **c**ontent) vorgeschlagen. Er bezieht sich auf die Wahrscheinlichkeit im Zusammenhang mit der Vorhersage des Genotyps eines Nachkommen mit mindestens einem kranken Allel auf der Basis eines eng gekoppelten Markers. Der *PIC* berechnet sich wie folgt:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 - 2 \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k (p_i p_j)^2. \quad (19)$$

Ein weiteres Maß für die Variation eines Markers stellt der Kehrwert des zu erwartenden Homozygotiegrades dar. Er wird als Schätzwert für die sogenannte effektive Anzahl der Allele k_e betrachtet (20):

$$\hat{k}_e = 1 / \left(\sum_{i=1}^k p_i^2 \right). \quad (20)$$

3. Ergebnisse

3.1 Molekulare Marker

3.1.1 RFLPs

Im Anschluß an eine *in vivo*-Massenexzision einer amplifizierten cDNA- λ -Bibliothek aus Roggenpollen wurden 87 Plasmid-Klone isoliert, deren durchschnittliche Insertgröße 0,64 kb betrug. Davon sind 29 Klone auf Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP) in der F₂-Kartierungspopulation untersucht worden. In diesen Fällen ließ sich eine effektive radioaktive Markierung mittels „Random Primed Labelling“ durchführen. Als Restriktions-enzyme dienten *Dra*I, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hind*III. Auf gleiche Weise wurde mit den zwei auf Chromosom 1R liegenden Klonen *Tri*25-11 und *pSc*T7 verfahren.

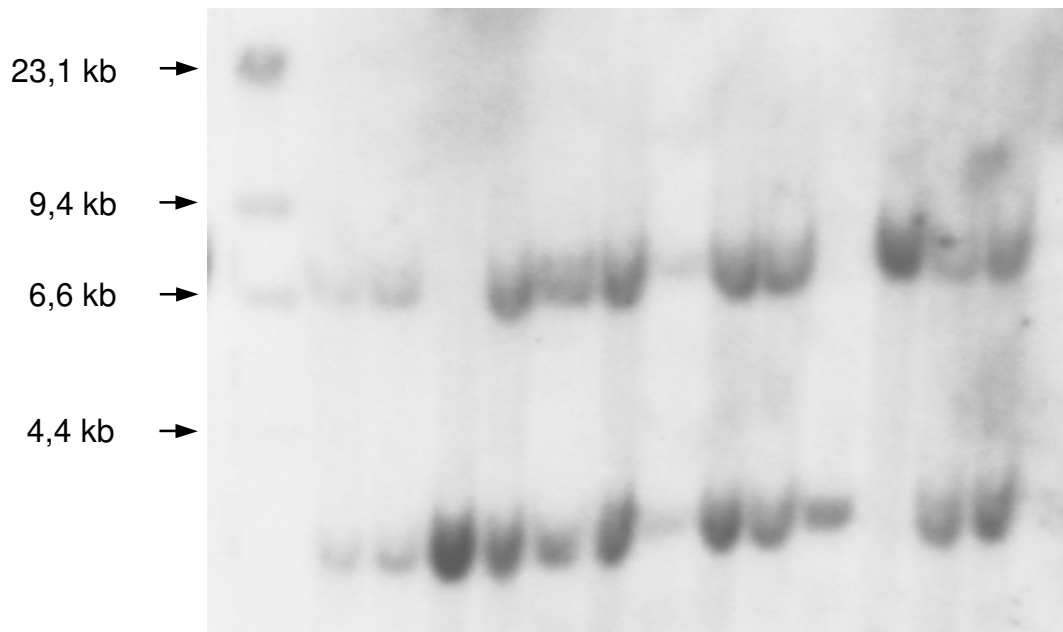


Abbildung 3.1: Aufspaltung des RFLP-Markers *Xiang318* in der F₂-Kartierungspopulation. Links sind die Größen von 4 Fragmenten des Standards λ *Hind*III angegeben.

Die Ergebnisse aus dem RFLP-Screening gehen aus Tabelle 3.1 hervor. 22 Klone (76 %) sind als single-copy (sc) einzustufen. Das heißt, sie tragen nur eine Kopie im Genom, während low copy-Klone (lc) 2 oder wenige Male vertreten sind. Polymorphismus in der Kartierungspopulation wurde lediglich bei 5 cDNA-Klonen festgestellt, wobei die Wahl des Restriktionsenzym in allen Fällen keine Rolle spielte. Dies entspricht einem Polymorphiegrad von 17 %. Kartierte cDNA-Klone wurden wie bei PHILIPP (1992) und

Tabelle 3.1: Ergebnisse aus dem RFLP-Screening der F₂-Kartierungspopulation mit 30 Klonen einer cDNA-Bibliothek des Roggens sowie den Klonen *Tri25-11* und *pScT7*

cDNA-Klon Nr.	Insertgröße [kB]	Signalstärke [†]	Kopienzahl [‡]	RFLP-Screening [*]
302	0,55	+	lc	m
303	0,75	+	sc	m
304	0,85	◦	lc	m
305	0,25	+	sc	m
306	0,35	◦	lc	m
309	0,65	+	lc	m
310	0,65	◦	sc	m
311	0,65	+	sc	p
312	1,8	+	sc	p
313	0,45	+	sc	p
314	0,6	+	sc	m
315	0,7	+	sc	m
317	0,65	◦	sc	m
318	0,35	+	sc	p
319	0,45	+	lc	m
320	0,5	+	lc	m
321	0,45	◦	sc	p
322	0,45	+	lc	m
323	0,85	+	sc	m
326	1,35	◦	sc	m
327	1,05	+	sc	m
328	0,4	+	sc	m
329	0,45	+	sc	m
331	0,7	+	sc	m
332	0,65	+	sc	m
336	0,55	+	sc	m
337	0,55	+	sc	m
339	0,4	◦	sc	m
340	0,75	+	sc	p

† + = deutliches Signal, ◦ = schwaches Signal

‡ sc = single-copy DNA, lc = low copy DNA

* m = monomorph in Kartierungspopulation, p = polymorph in Kartierungspopulation

SENFT (1996) gemäß einem Vorschlag von HART und GALE (1988) mit *X* und dem Namen des Instituts (*institute of applied genetics*) mit *Xiag* und der dazugehörigen Klon-Nummer versehen. Abbildung 3.1 zeigt am Beispiel der cDNA-Sonde *Xiag318* und des Enzyms *EcoRV* einen RFLP in der Kartierungspopulation. Die Klone *Tri25-11* und *pScT7* waren ebenfalls für alle Enzyme polymorph, obwohl bei der zuletzt genannten Sonde das Signal des polymorphen Locus nur schwach ausgeprägt war und deshalb keine Auswertung zuließ. *pScT7* zeigte ein leiterähnliches Signal, das dem einer tandemrepetitiven Sequenz wie der 5S-DNA entspricht.

3.1.2 RAPDs

Für die Überprüfung auf Polymorphismus der in 2.2.3.1 aufgelisteten OPERON-Primer wurden mindestens 11 Pflanzen herangezogen, um bei dominanter Spaltung mit mehr als 95%iger Sicherheit eine spaltende RAPD-Bande aufdecken zu können. Aus der getroffenen Vorauswahl an Primern, die von SENFT (1996) als reproduzierbar beschrieben worden sind, wird bereits deutlich, daß Unterschiede zwischen Primerklassen in ihrer Eignung zur Darstellung von RAPDs beim Roggen bestehen. In Tabelle 3.2 sind die Ergebnisse des Primer-Screenings zusammengefaßt. Im Mittel über alle getesteten Primer-Sets führte die PCR-Amplifikation bei etwa 15 von 100 Primern zur Erzeugung mindestens einer polymorphen Bande. Wird der Anteil polymorpher Loci an der Gesamtzahl amplifizierter Banden zugrundegelegt, liegt der angegebene Polymorphiegrad noch niedriger, da im Durchschnitt weniger als die Hälfte aller Banden einen Polymorphismus erzeugen. Es ist festzustellen, daß zwischen den Primer-Sets Unterschiede darin bestehen, in der Kartierungspopulation Polymorphismen aufzudecken. Ohne Berücksichtigung des unvollständigen Primersets M beträgt die Anzahl polymorpher Primer im Mittel 2,96. Wird unterstellt, daß theoretisch in jedem der 12 Primer-Sets dieser Anteil zu erwarten ist, wird mit dem G-Test (Likelihood ratio-Test) ein signifikante Abweichung ($G = 18,7$; $\chi^2_{5\%}(10 \text{ FG}) = 18,3$) erhalten. Dies wird am Beispiel des Primersets O deutlich. Die theoretische Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von 8 polymorphen Primern in einem Set bei einem Erwartungswert von 2,96 entspricht gemäß der Binomialverteilung nur 0,39 %.

Modifikationen des RAPD-Verfahrens, wie etwa die von RIEDE *et al.* (1994) vorgeschlagene Restriktion der genomischen DNA vor der PCR-Amplifikation erbrachten keine substantiellen Verbesserungen hinsichtlich Polymorphismus und Reproduzierbarkeit dieser Markermethode.

Tabelle 3.2: RAPD-Primer-Screening verschiedener OPERON-Sätze. Die drei letzten Spalten fassen die experimentellen Befunde dieser Arbeit und die von SENFT (1996) zusammen.

OPERON Primer- Set	Anzahl untersuchter Primer	Anzahl polymorpher Primer	Gesamtzahl untersuchter Primer[†]	Gesamtzahl polymorpher Primer[†]	Gesamtzahl polymorpher Primer (%)[†]
A	9	0	20	2	10,0
B	8	1	20	2	10,0
C	15	0	20	3	15,0
M	13	2	17	3	17,6
N	10	3	20	4	20,0
O	13	3	20	8	40,0
P	20	4	20	4	20,0
Q	18	2	20	2	10,0
R	18	2	20	3	15,0
S	5	0	20	0	0
V	9	0	20	0	0
X	2	1	20	4	20,0
Y	2	1	20	3	15,0
Gesamt	142	19	257	38	14,8

[†] Die Zahlen in diesen Spalten ergeben sich aus den Spalten 2 und 3 sowie aus Untersuchungen von SENFT (1996)

3.1.3 Simple Sequence Repeats (SSRs)

Das Prinzip der Analyse von SSRs (Mikrosatelliten) ist in Abbildung 3.2 dargestellt. Die DNA-Sequenz, die dem SSR-Motiv benachbart ist, wird benötigt, um sich ein Primerpaar für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zu erstellen. Die Erschließung der DNA-Sequenz einschließlich des SSRs erfolgt entweder aus DNA-Datenbanken oder durch Klonierung des Roggengenoms in Form von DNA-Bibliotheken und deren Sichtung mit SSR-Sonden, welcher die Sequenzierung positiver Klone folgt. Als SSR-Sonden dienen hier einzelsträngige, jeweils 20 Basen lange Oligonukleotide der Form $(CT)_{10}$ und $(GT)_{10}$. $(AT)_n$ - und $(GC)_n$ -Motive aus Datenbanken können zur Erzeugung von Markern genutzt werden, scheiden aber als Sonden aufgrund ihrer Selbstkomplementarität aus. Die Inserts positiver Klone besitzen links und rechts des SSR-Motivs Sequenzen, aus welchen Primer für die PCR entwickelt werden. Die PCR dient der Vermehrung des SSR-Motivs, das den

variablen Anteil des Amplifikationsproduktes darstellt. Diese Variation, die sich in einem Längenunterschied zwischen den Amplifikationsprodukten zweier oder mehrerer Individuen manifestiert, kann mittels Elektrophorese in einer Matrix aus Agarose oder Polyacrylamid dargestellt werden.

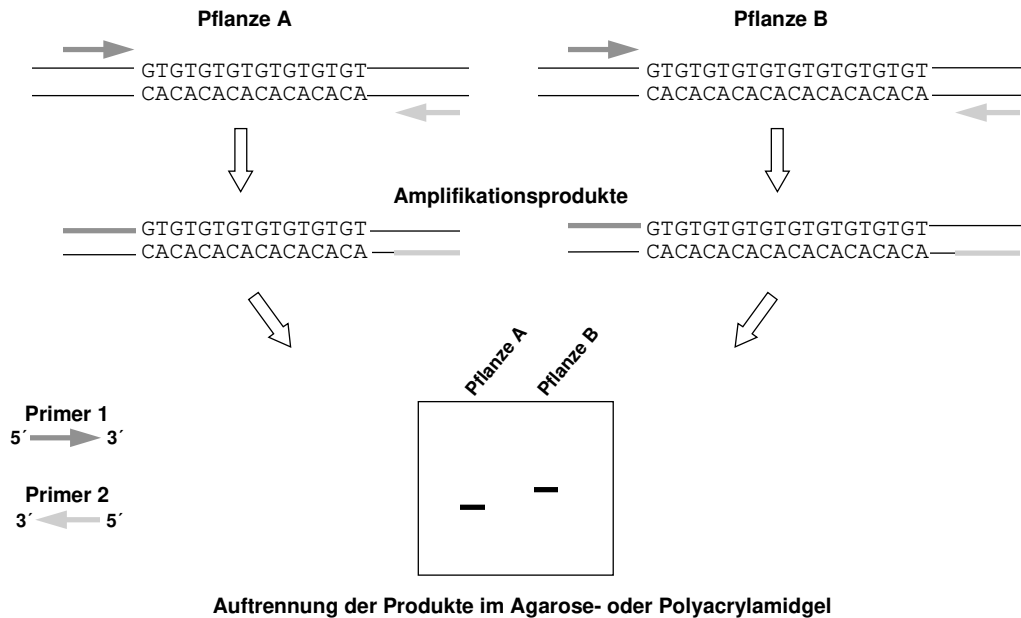


Abbildung 3.2: Darstellung der Analyse von SSRs (verändert nach KOCHERT 1994). Die Pflanzen A und B unterscheiden sich durch die Zahl der Wiederholungseinheit GT. Nach Amplifikation des SSRs durch PCR und Auftrennung der Amplifikationsprodukte kann dieser Polymorphismus sichtbar gemacht werden.

Datenbanksuche

In der Ausgabe 102.0 (10.9.1997) der DNA-Datenbank „GenBank“ sind 70 Einträge für die Gattung *Secale* ausgewiesen. Nach Eliminierung plastidärer sowie identischer, lediglich unter anderen Bezeichnungen aufgeführter Sequenzen sind 45 Einträge mit einer Gesamtlänge von 57 kb nach 1 bp-, 2bp- und 3bp-SSR-Motiven durchsucht worden. Als minimale Anzahl sind 12 Wiederholungseinheiten für 1 bp-Motive, 6 Einheiten für 2 bp-Motive und 4 Einheiten für 3 bp-Motive festgelegt worden. Unter Verwendung des Suchprogramms FASTA 2.0 (B. Pearson, Universität von Virginia, USA) konnte keiner der Einträge die genannten Kriterien erfüllen.

Musterung genomischer DNA-Bibliotheken mit (CT)₁₀ und (GT)₁₀

Nach Restriktion genomischer nukleärer Roggen-DNA mit *AluI* und *HaeIII*, welche jeweils eine spezifische 4 bp-Sequenz erkennen, lagen die meisten DNA-Fragmente in einer Länge zwischen 200 und 1500 bp vor. In diesem Bereich kann eine DNA-Sequenzierung in einem Schritt, das heißt ohne Subklonierung erfolgen, so daß eine Größenselektion nicht erforderlich war. Nach Auftrennung dieser DNA in einem Agarosegel wurde eine Southern-Hybridisierung mit radioaktiv markiertem (CT)₁₀ und (GT)₁₀ durchgeführt. Abbildung 3.3 zeigt für beide Sonden ein Signal, das sich kontinuierlich über nahezu den gesamten Fragmentbereich erstreckt. Das im Vergleich zu (CT)₁₀ stärker erscheinende Signal von (GT)₁₀ tritt vor allem zwischen 100 bp und 2000 bp auf, während nach Hybridisierung mit (CT)₁₀ vornehmlich Fragmente zwischen 100 bp und 1000 bp hervorstechen.

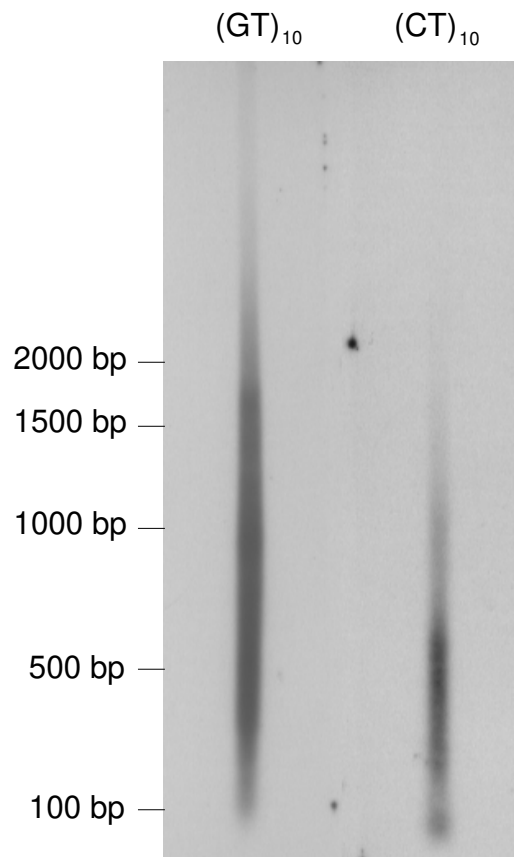


Abbildung 3.3: Autoradiogramm nach Southern-Hybridisierung von *AluI*-restringierter genomischer Roggen-DNA mit den Oligonukleotiden (CT)₁₀ und (GT)₁₀. Hybridisierung und Waschen der Membran mit 2x SSC fanden bei 60°C statt.

Diese DNA-Fragmente wurden dazu verwendet, eine genomische Bibliothek im Phagemid-Vektor pBluescript SK zu erstellen. Hierzu sind die Fragmente in die *EcoRV*-Stelle des Vektors kloniert worden. In zwei anderen Experimenten wurden umfangreichere Bibliotheken im Phagen λ ZAP Express erzeugt. Hierfür wurde zum einen *MboI*-restringierte, zum anderen *PstI/Sau3AI*-restringierte Roggen-DNA in die *BamHI*-Stelle des Vektors eingesetzt. Tabelle 3.3 zeigt eine Übersicht über die Charakteristiken der drei Bibliotheken.

Tabelle 3.3: Art, verwendete Restriktionsenzyme, durchschnittliche Insertgrößen und Transformationseffizienzen dreier Bibliotheken für die Suche nach $(CT/GA)_n$ - und $(GT/CA)_n$ -Motiven

Bibliotheksbezeichnung	Vektor	Restriktionsenzyme	mittlere Insertgröße (kb)	Transformations-effizienz [†]
A	pBluescript SK	<i>AluI</i> , <i>HaeIII</i>	0,5	$2 \cdot 10^4$
B	λ ZAP Express	<i>MboI</i>	0,6	$8 \cdot 10^5$
C	λ ZAP Express	<i>PstI/Sau3AI</i>	0,5	$1 \cdot 10^5$

[†] in cfu/ μ g (Bakterien) bzw. pfu/ μ g (Phagen)

Im Screening-Verfahren sind aus zeitlichen Gründen die Sonden $(CT)_{10}$ und $(GT)_{10}$ zusammen eingesetzt worden. Daher war es zunächst nicht möglich, die als positiv erkannten Klone als $(CT/GA)_n$ oder $(GT/CA)_n$ tragende einzustufen. Für die beiden Sonden wurde eine nach der „nearest neighbor-Methode“ (BRESLAUER *et al.* 1986) ermittelte, unter 2x SSC stattfindende optimale Hybridisierungs- und Waschttemperatur von 60°C eingestellt. Die im ersten Screening isolierten Plaques stellen aufgrund der hohen Plattierungsdichte Mischungen aus positiven und negativen Klonen dar. Ein zweites Screening führte zur Isolierung der Einzelklone, die als Plasmide mittels eines Dot-Blots noch einmal getestet wurden. Wie aus Tabelle 3.4 zu ersehen ist, sind insgesamt etwa 161.000 Klone überprüft worden, von denen im ersten Screening 352, und im zweiten Screening 182 ein positives Signal ergaben. Dies entspricht einer relativen Häufigkeit der SSR-Motive $(CT/GA)_n$ und $(GT/CA)_n$ zwischen 0,11 % und 0,22 %. Die einzelnen Bibliotheken spiegeln dieses Resultat wider.

Tabelle 3.4: Ergebnisse des Screenings der drei angelegten Bibliotheken mit den Sonden $(CT)_{10}$ und $(GT)_{10}$

Biblio- thek	Anzahl Klone (ca.)	Gesamt- länge (kb)	Anzahl positiver Klone		Positive Klone (%)	
			1. Screening	2. Screening	1. Screening	2. Screening
A	1000	500	2	2	0,20	0,20
B	140.000	84.000	305	155	0,22	0,11
C	20.000	10.000	45	25	0,23	0,13
Gesamt	161.000	94.500	352	182	0,22	0,11

Die als positiv erkannten Phagen wurden mittels *in vivo*-Exzision in Phagemide überführt und vermehrt. In dieser Form ist eine DNA-Sequenzierung am einfachsten durchzuführen. Die automatische Sequenzierung mit Fluoreszenz-markierten Primern erlaubt im Gegensatz zur manuellen Vorgehensweise einen schnelleren Durchsatz und größere Leseweiten. Insgesamt sind 74 Klone sequenziert worden. Eine Charakterisierung wurde in Tabelle 3.5 vorgenommen.

Tabelle 3.5: Charakterisierung von SSRs aus drei genomischen DNA-Bibliotheken des Roggens. Die Werte in Klammern geben die prozentuale Häufigkeit bezogen auf die Anzahl sequenzierter Klone an. Erklärungen zu den drei letzten Spalten sind im Text wiedergegeben.

Biblio- thek	Anzahl sequenzierter Klone	perfekt	zusammen -gesetzt	imperfekt	$(CT/GA)_n$ †	$(GT/CA)_n$ †
A	2	2 (100)	0 (0)	0 (0)	2 (100)	0 (0)
B	57	30 (52,6)	14 (24,6)	13 (22,8)	11 (19,3)	19 (33,3)
C	15	10 (66,7)	1 (6,7)	4 (26,7)	3 (20,0)	7 (46,7)
Gesamt	74	42 (56,8)	15 (20,3)	17 (23,0)	16 (21,6)	26 (35,1)

† Diese Angaben beziehen sich ausschließlich auf perfekte repeats

Abbildung 3.4 zeigt die Sequenzen zweier SSRs unterschiedlicher Struktur. SSRs werden als perfekt (perfect repeats) bezeichnet, wenn ein bestimmtes Motiv, beispielsweise $(CT)_n$,

weder unterbrochen noch in ein anderes Motiv, etwa $(CA)_n$ übergeht (Abb. 3.4b). Zusammengesetzte SSRs (compound repeats) bestehen aus mehreren Motiven ohne Basenunterbrechungen (Abb. 3.4a). SSRs werden imperfekt (imperfect repeats) genannt, wenn SSR-Motive durch eine oder mehrere der 4 Basen unterbrochen sind. Zusammengesetzte und imperfekte repeats lassen nicht immer einen eindeutigen Schluß zu, ob es sich um einen $(CT/GA)_n$ - oder um einen $(GT/CA)_n$ -SSR handelt. Aus diesem Grund wurden zur Berechnung ihrer Häufigkeiten nur perfekte repeats herangezogen.

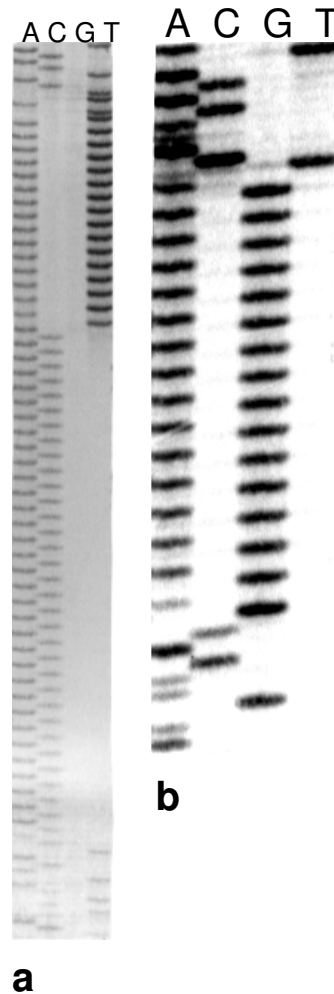


Abbildung 3.4: Sequenz zweier Roggen-SSRs. a) ein zusammengesetzter Mikrosatellit $(AC)_{33}(AT)_{16}$. b) ein perfekter Mikrosatellit $(AG)_{16}$

Somit ergibt sich für das $(CT/GA)_n$ -Motiv eine durchschnittliche Frequenz von 38,1 % und für $(GT/CA)_n$ von 61,9 %. Werden zusammengesetzte und imperfekte SSRs berücksichtigt, verschiebt sich dieses Verhältnis weiter zugunsten von $(GT/CA)_n$. Die Befunde aus der Bibliothek A lassen wegen ihres geringen Umfangs keine zu verallgemeinernde Aussage

zu. Während mehr als die Hälfte der SSRs perfekte repeats darstellen, kommen zusammengesetzte und imperfekte Mikrosatelliten etwa gleich häufig vor. Auffällig erscheint bei zusammengesetzten repeats das Übergewicht des $(GT)_n$ -Motivs. Dieses war als $(GT)_m(AT)_n$ achtmal (53,3 %), als $(CT)_m(GT)_n$ fünfmal (33,3 %) zu beobachten, also insgesamt zu 86,7 %. Die Länge der repeats reichte von 8 Wiederholungseinheiten bis zu über 60 Einheiten. Die Sequenzierung derartiger Klone führte jedoch zum Abbruch der Reaktion im tandemrepetitiven Bereich. Dadurch wurde eine zweite Sequenzierung von der anderen Klonierungsstelle her notwendig. In einigen Inserts waren auch extrem hohe GC-Gehalte (> 80%) für die Abnahme der Lesegenauigkeit verantwortlich. In anderen Fällen lag das SSR-Motiv so nahe an der Klonierungsstelle, daß die Konstruktion eines Primer-paares nicht möglich war. So sind für insgesamt 57 Klone flankierende Primerpaare entwickelt worden. Nach Auftrennung des PCR-Ansatzes in Metaphor™-Agarose konnten für 27 Primerpaare (47,4 %) spezifische Produkte erhalten werden, deren jeweilige Größe im Bereich der zu erwartenden Größe lag, welche durch die Wahl der beiden Primer aus der bekannten, klonierten DNA-Sequenz festgelegt worden ist. Auf diese Weise kann für ein oder mehrere PCR-Produkte aus der DNA des Standards, nämlich der Sorte 'Carokurz', und der F₂-Kartierungspopulation eine Aussage getroffen werden, ob der klonierte Locus amplifiziert wurde. Die Abbildungen 3.5a und 3.5b verdeutlichen die Problematik am Beispiel der SSR-Marker SCM2 und SCM5 (*Secale cereale* microsatellite). Der Marker SCM2 detektiert nur einen Locus, der in der F₂-Kartierungspopulation aufspaltet und kodominant ausgeprägt wird. Der Marker SCM5 erzeugt neben dem polymorphen SSR-Locus, der sich zwischen 290 und 300 bp befindet, eine zusätzliche, mit Null-Allel spaltende Bande bei etwa 650 bp, in der aber, wie durch eine Kontrollhybridisierung festgestellt werden konnte, kein SSR-Motiv enthalten war.

Von den 27 SSR-Markern war bei 7 jeweils ein zusätzlicher monomorpher Locus mit kleinerer Bandengröße zu beobachten. Mit den übrigen 30 Primerpaaren gelang es jedoch nicht, die theoretisch zu erwartenden SSR-Loci zu amplifizieren, und zwar weder durch Veränderung der Mg²⁺-Konzentration im Reaktionsgemisch noch durch Variation der Annealing-Temperatur. So traten entweder Banden mit stark abweichender Größe auf, oder es entstanden gestreckte Bereiche mit unspezifischer Amplifikation. Der Marker SCM39 konnte erst durch Wahl eines anderen Primerpaars erhalten werden. Zusätzlich zu den selbst erarbeiteten Roggen-SSR-Markern sind 6 Mikrosatelliten-Marker des Weizens (RÖDER *et al.* 1995) in die Untersuchungen einbezogen worden. Namentlich WMS2, WMS6, WMS30, WMS33, WMS44 und WMS46 sind von den Autoren als geeignet beschrieben worden, auch beim Roggen spezifische Amplifikationsprodukte zu erzeugen.

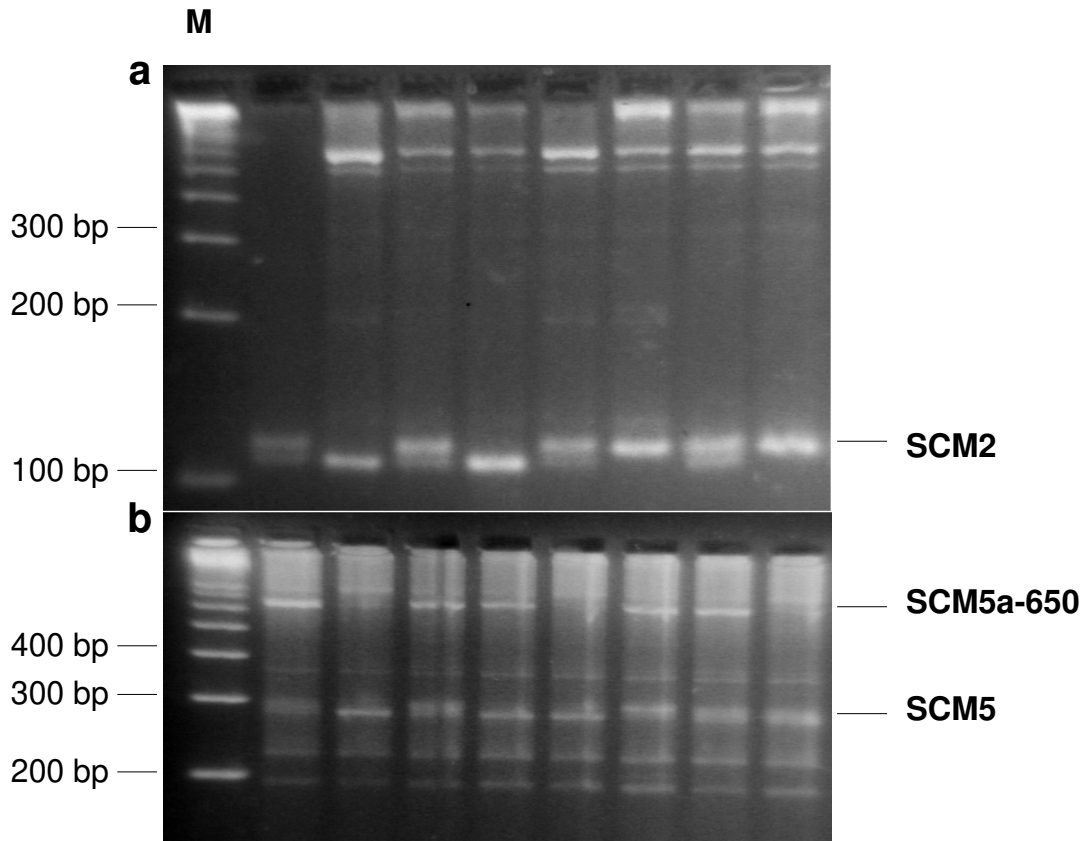


Abbildung 3.5: Darstellung eines SSR-Polymorphismus am Beispiel von SCM2 (a) und SCM5 (b). Als Größenmarker wurde eine 100 bp-Leiter verwendet.

Eigene Untersuchungen unter den von den Autoren angegebenen Bedingungen führten nur bei WMS2, WMS6 und WMS44 zu spezifischen Produkten, deren jeweilige Größe von der der Weizensorte 'Chinese Spring' mehr oder weniger deutlich abwich. Neben den 27 als spezifisch bewerteten SSR-Marker des Roggens sind diese 3 Mikrosatelliten-Marker des Weizens auf Polymorphismus in der Kartierungspopulation geprüft worden. In Tabelle 3.6 ist die Bezeichnung, die Sequenz der Primerpaare, die Annealing-Temperatur sowie die Größe des Amplifikationsprodukts aus der klonierten Sequenz bzw. in der Kartierungspopulation wiedergegeben.

Tabelle 3.6: Primerpaar-Sequenzen, Produktgrößen, Annealingtemperatur und SSR-Motiv von 27 SSR-Markern des Roggens und 3 SSR-Markern des Weizens (RÖDER *et al.* 1995)

SSR-Marker	Primerpaar-Sequenzen (5' → 3')	Größe des Amplifikationsprodukts (bp) [†]	Annealing-Temperatur (°C)	SSR-Motiv
SCM2	GATGACTATGACTACCAGGATGAA GGAGTGAGAAGGCCGAGAAG	113	55	GT
SCM5	TCGCGATACATCAAGATCGTG CTAGCATCGACGTAACCCCTTT	285 [‡]	50	CT
SCM9	TGACAACCCCTTTCCCTCGT TCATCGACGCTAAGGAGGACCC	220	60	GT
SCM28	CTGGTCCTGGTCTGGTGGGTC CGCATCGGGTGTGTCGCATAC	160	60	GT
SCM39	GACCTCAGTGGAGCCTCTAGGT GGACATCTGCCGTGACAATACC	230	60	GT,GC
SCM40	CCCTTCAGCGGTCATTGTTG CACATCTTGGGCCTGACACC	159	60	GT
SCM43	CTAGGGGATTACAGGGAGGGCA GTTCCCTTGTCCTACTCGTTACCG	100	60	GT
SCM65	CCCGTCCTTCAGTTATGTATGG TTTGATCGATGAAGAGAGCCA	295	60	GT
SCM69	CTACCTGCTGTTCCCATTTGG GTGTGTAGAAGATGTTGTCTGG	144	60	GT
SCM75	TTTTCTATCTCAGCGATTCATGC TCCTGAGATCAAGTGCGTGTG	191	60	CT,CA
SCM86	CAGATAGATGGGTGTTGTGCG CTCTTCTCGACATCCACACTCC	117	60	GT
SCM101	GCCAGCCGCCACCTTAATTG AGCCCAACTCTTTCGTGCATG	170	60	CT
SCM102	AACAAGTGCAGAACTCGCGT CAGAAAGTCTTGGGGCCAG	208	60	CT
SCM104	GATAGTGGGACATTTGGGTACG GCCATTTCCCATTAGTACGG	173	60	GT
SCM109	AACCCCTTTTCGTACCTTGT TAAAGCAAACCACAGAGCC	98	60	GT
SCM111	TGCAGATTCACTTATCAACACACAC TCTGATATCTTTCCAACGGCGT	233	60	GT
SCM120	CATTGTTGCGAGTGTGAAGC TGTGCTGTCGTCGATGTTGTC	127	60	GT
SCM138	ATAGCCGCAGATGGTTGAGGAC GAGAAGTCTACAAATCAAGGGGGC	188	60	GT

Fortsetzung der **Tabelle 3.6**

SSR-Marker	Primerpaar-Sequenzen (5' → 3')	Größe des Amplifikationsprodukts (bp) [†]	Annealing-Temperatur (°C)	SSR-Motiv
SCM180	GTTTCGTCCCCGTTGCCATC ACGTGTCGCTTTCCATTGCC	140	60	GA,GT
SCM206	TCATCGAAAGACGGGACACCT ACGATTGCTGCTAATAGCCATGTG	171	60	GT,AT
SCM243	AGTTGCCGCAGTATTTCTCA AACTTAACAATGGTTTCGAGGG	110	60	GT
SCM256	CTAATTGCCTCACAGAACTATCA CCAGAGAACAACACAGATCAGC	137	60	GT,GC
SCM268	GCGCACCCACACAACACG GCGGTGGCGTTGAGGAC	152	65	GT
SCM273	GAGTGGTCGCCATATAACCGTG TTCGTGAATACCCTGTTTAGCAAG	214	60	GT
SCM304	CATCGGATCACATTCACTTAGTTCTG TAACGCCACCACCAAGCCTTC	267	60	GT
SCM306	GTGTCGCGTGTCTTCGGC AGCCAGCTGCGGTCACCCC	188	65	GT
SCM307	GTAATCAATCTACTACTCTTTCA CCTTCTGCTGTCATTGTTGG	130	55	GT
WMS2*	CTGCAAGCCTGTGATCAACT CATTCTCAAATGATCGAACA	ca. 260 [‡]	50	GT
WMS6*	CGTATCACCTCCTAGCTAAACTAG AGCCTTATCATGACCCTACCTT	150 [‡]	50	CT
WMS44*	GTTGAGCTTTTCAGTTCGGC ACTGGCATCCACTGAGCTG	ca. 140 [‡]	50	CT

† Die Größenangaben beziehen sich auf das zu erwartende Amplifikationsprodukt der klonierten Sequenz aus der Sorte 'Carokurz'. In dieser Populationssorte existieren sehr wahrscheinlich auch andere Mikrosatelliten-Allele und damit Amplifikationsprodukte unterschiedlicher Größen

‡ Diese Größe bezieht sich auf das kleinere Amplifikationsprodukt (Marker-Allel) in der spaltenden Kartierungspopulation des Roggens, die am Institut für Angewandte Genetik erstellt wurde.

* Die Angaben zu diesen SSR-Markern sind zum Teil aus RÖDER *et al.* (1995) entnommen. Für WMS2 und WMS44 ist nicht klar, ob sich ein SSR-Motiv im Produkt befindet.

In der Kartierungspopulation wiesen 12 SSR-Marker des Roggens (44,4 %) und ein Marker aus Weizen (WMS6) einen für SSRs typischen kodominanten Erbgang auf. WMS44 spaltete ebenso wie SCM5-650 mit Null-Allel. Bei letzterem konnte gezeigt werden, daß bereits der Primer SCM5a für die Amplifikation dieses Locus ausreicht, so daß von einem „spezifischen RAPD-Locus“ gesprochen werden kann. Tabelle 3.7 gibt

noch einmal einen Überblick über die PCR-Untersuchungen mit SSR-spezifischen Primern von Roggen und Weizen.

Tabelle 3.7: Vergleichende Ergebnisse der PCR-Untersuchungen mit den entwickelten Primerpaaren von SSR-Loci des Roggens und ausgewählten Primerpaaren von Weizen-SSRs (RÖDER *et al.* 1995)

Herkunft der SSR-Primer	Anzahl untersuchter Primerpaare †	Anzahl spezifischer Amplifikate †	Anzahl polymorpher SSR-Loci ‡
Roggen	57 (100)	27 (47,4)	12 (44,4)
Weizen	6*	3	1
Gesamt	63 (100)	30 (47,6)	13 (43,3)

† In Klammern sind prozentuale Häufigkeiten angegeben

‡ Die prozentuale Häufigkeit in Klammern bezieht sich auf die Anzahl spezifischer Amplifikate. Auf Polymorphismus wurde in der F₂-Kartierungspopulation getestet.

* Diese Primerpaare sind nach RÖDER *et al.* (1995) für Roggen geeignet

Während die in Tabelle 3.7 aufgeführten 13 polymorphen SSR-Loci und weitere 2 dominante Loci genetisch kartiert wurden, ließen sich einige der monomorphen SSR-Marker des Roggens mit Hilfe von disomen Weizen/Roggen-Additionslinien chromosomal zuordnen. Für einige Chromosomen standen auch ditelosome Additionslinien zur Verfügung (Tabelle 2.1). Es ist gelungen, für 8 SSR-Marker des Roggens, die keine Aufspaltung in der Kartierungspopulation zeigten, die chromosomale Lage zu ermitteln. In allen Fällen waren zusätzliche, für Weizen spezifische Amplifikate zu beobachten, da sie im Weizenelter 'Chinese Spring' (CS) und in den Additionslinien auftraten, jedoch nicht im Roggen-Donor 'Imperial' (Imp). In Abbildung 3.6 wird dies am Beispiel des SSR-Markers SCM9 deutlich. Jeweils ein Roggen-spezifisches Amplifikationsprodukt, dessen Größe zwischen 200 bp und 240 bp liegt, läßt sich für 'Imperial', die disome Additionslinie CS + 1R Imp und die ditelosome Additionslinie CS + 1RS Imp nachweisen. (CS + 1R Imp bedeutet, daß die hexaploide Weizensorte 'Chinese Spring' das Chromosomenpaar 1R von 'Imperial'-Roggen trägt. In CS + 1RS Imp liegt neben dem normalen Chromosomensatz des Weizens ein Paar des kurzen Arms von 1R (1RS) von 'Imperial' vor.) In 'Chinese Spring' und den übrigen Additionslinien taucht ein Weizen-spezifisches Produkt mit einer Größe zwischen 110 bp und 123 bp auf, nicht aber in 'Imperial'. Daß dieses Produkt nicht oder nur schwach in CS + 1R Imp und CS + 1RS Imp erscheint, läßt sich dadurch erklären, daß der für die Primer spezifischere Roggen-SSR-Locus bevorzugt

amplifiziert wird. Auffällig ist auch der geringfügige Unterschied in der Größe des roggen-spezifischen Amplifikats. Dieser wird dadurch hervorgerufen, daß die für die Additionen verwendeten Pflanzen von `Imperial` ein anderes Marker-Allel tragen als die Kontrollpflanze. Es ist davon auszugehen, daß die Sorte `Imperial`, die nur durch freie Abblüte vermehrt werden kann, im Gegensatz zu den Liniensorten des Weizens für diesen Locus variabel ist.

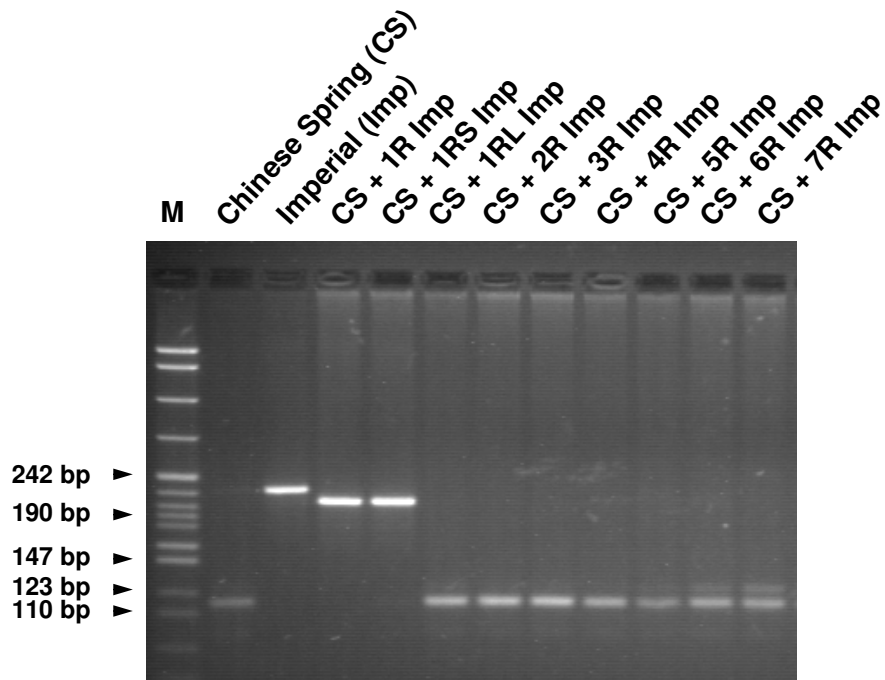


Abbildung 3.6: Chromosomale Lokalisation des Roggen-SSR-Markers SCM9 mit Hilfe von disomen und ditelosomen `Chinese Spring`/`Imperial`-Additionslinien. Ein deutliches Amplifikationsprodukt des Roggen-SSRs ist bei den Additionslinien CS + Imp 1R und CS + Imp 1RS zu erkennen. M = pBR322 *Msp*I

Tabelle 3.8 zeigt eine Übersicht über alle in dieser Arbeit genetisch kartierten und chromosomal lokalisierten SSR-Loci von Roggen und Weizen. Daraus wird ersichtlich, daß mit Ausnahme von Chromosom 4R mindestens zwei SSR-Marker auf jedem der anderen Roggenchromosomen vertreten sind. Der SSR-Marker SCM306 spaltet zwar in der Kartierungspopulation, läßt sich jedoch keinem Chromosom eindeutig zuordnen.

Tabelle 3.8: Genetisch kartierte und chromosomal lokalisierte SSR-Loci von Roggen und Weizen im Roggen.

SSR-Marker	genetische Kartierung	chromosomale Lokalisation
SCM2	6RL	
SCM5	3RL	
[SCM5a-650 [†]	4RL]	
SCM9		1RS
SCM28	6RL	
SCM39	1R	
SCM40	7R	
SCM43	2R	
SCM69	2R	
SCM75		2RL
SCM86	7R	
SCM101		6R
SCM102		3RS
SCM109		5RL
SCM120		5RL
SCM138	5RS	
SCM180	6R	
SCM206		3RS
SCM268		5RS
SCM304	6RS	
WMS6	5RL	
[WMS44	6R]	

[] Diese Marker spalten mit Null-Allel, beruhen also nicht auf einem SSR-Polymorphismus.

3.1.4 AFLPs

Diese erst kürzlich beschriebene Markertechnologie (VOS *et al.* 1995) nutzt die PCR zur selektiven Vermehrung von spezifischen Restriktionsfragmenten. Wie bei den RAPDs handelt es sich um ein Multi-Locus-Verfahren, so daß AFLPs als eine Variante des „DNA-

Fingerprintings“ zu bezeichnen sind. Der Ablauf einer AFLP-Analyse ist exemplarisch in Abbildung 3.7 dargestellt.

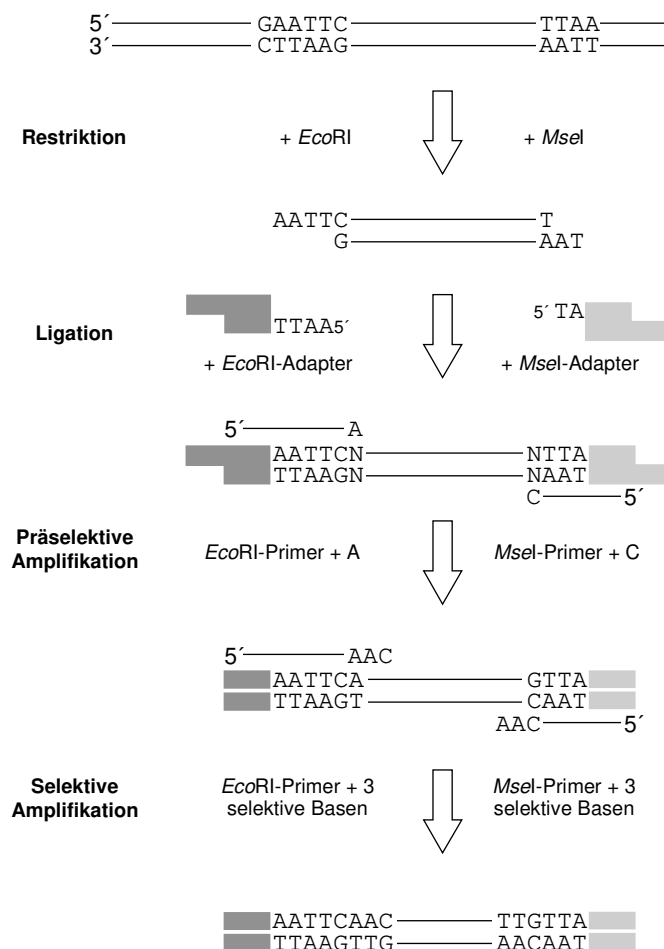


Abbildung 3.7: Prinzip der AFLP-Analyse am Beispiel der Primerkombination E32M47 (E00 + AAC und M00 + CAA).

Der erste Schritt besteht in der Zerlegung der genomischen DNA mit einer 6 bp erkennenden („6 bp cutter“) und einer 4 bp erkennenden Restriktionsendonuklease („4 bp cutter“), beispielsweise *EcoRI* und *MseI*. An die Restriktionsfragmente werden anschließend etwa 20 bp lange Adapter ligiert, deren 5'→3'-Sequenzen als Anker-Primer für nachfolgende PCR-Reaktionen dienen. Zur Eingrenzung der Zahl der Amplifikate werden in zwei Stufen die *EcoRI*- und *MseI*-Primer an ihrem 3'-Ende verlängert. Die Primer für die präselektive PCR-Amplifikation tragen an diesem Ende *eine* zusätzliche Base, für die darauffolgende selektive Amplifikation werden *drei* zusätzliche Basen an beide Primer

angehängt, so daß theoretisch die Zahl der Produkte aufgrund der Selektivität um den Faktor $4^6 = 4096$ abnimmt. Eine weitere Reduktion der Bandenzahl wird dadurch erreicht, daß vor der selektiven Amplifikation nur der *EcoRI*-Primer (radioaktiv oder mit einem Fluoreszenzfarbstoff) markiert wird. Somit werden nach Auftrennung der Amplifikationsprodukte überwiegend solche nachgewiesen, die von *EcoRI/MseI*-Fragmenten stammen. Polymorphismen können durch die unterschiedliche Länge von Restriktionsfragmenten oder durch Basenmutationen hervorgerufen werden.

Tabelle 3.9: AFLP-Untersuchungen mit 18 *EcoRI/MseI*-Primerkombinationen und ihr Polymorphiegrad in der F_2 -Kartierungspopulation.

<i>EcoRI</i> -Primer	<i>MseI</i> -Primer	Anzahl Banden (ca.) [†]	polymorph	polymorph (%)
E32	M47	50	4	8,0
E32	M49	50	5	10,0
E33	M47	80	6	7,5
E33	M48	80	13	16,3
E33	M59	90	7	7,8
E33	M60	80	10	12,5
E33	M61	70	4	5,7
E33	M62	50	4	8,0
E36	M48	60	4	6,7
E36	M49	60	9	15,0
E36	M59	80	15	18,8
E36	M60	60	5	8,3
E36	M61	80	15	18,8
E36	M62	75	8	10,7
E37	M47	60	8	13,3
E37	M48	45	15	33,3
E37	M49	40	6	15,0
E37	M50	70	10	14,3
Alle Primerkombinationen		1180	148	12,5

[†] Auf- bzw. abgerundete Zahl der Banden zwischen 80 bp und 450 bp

Die hier durchgeführten Untersuchungen erstreckten sich auf 18 von insgesamt 64 im „AFLP Analysis System I“ (Gibco BRL, Eggenstein) angebotenen Primerkombinationen.

Die Auswahl orientierte sich nach empfohlenen Kombinationen für die AFLP-Analyse bei Gerste. Für Screening-Zwecke wurden zunächst 24 Pflanzen der Kartierungspopulation auf Polymorphismus überprüft. Bei Kombinationen mit einem hohen Polymorphiegrad wurden die Untersuchungen zum Zweck der genetischen Kartierung auf 53 bis 66 Pflanzen ausgedehnt. Tabelle 3.9 zeigt die Ergebnisse des Primer-Screenings. So wurden innerhalb des Bereichs von 80 bp und 450 bp zwischen 40 und 90 Banden gezählt. Oberhalb von 450 bp waren Banden nicht mehr deutlich voneinander zu trennen, bei Banden mit einer Länge < 90 bp handelte es sich meist um nicht vollständig amplifizierte Produkte.

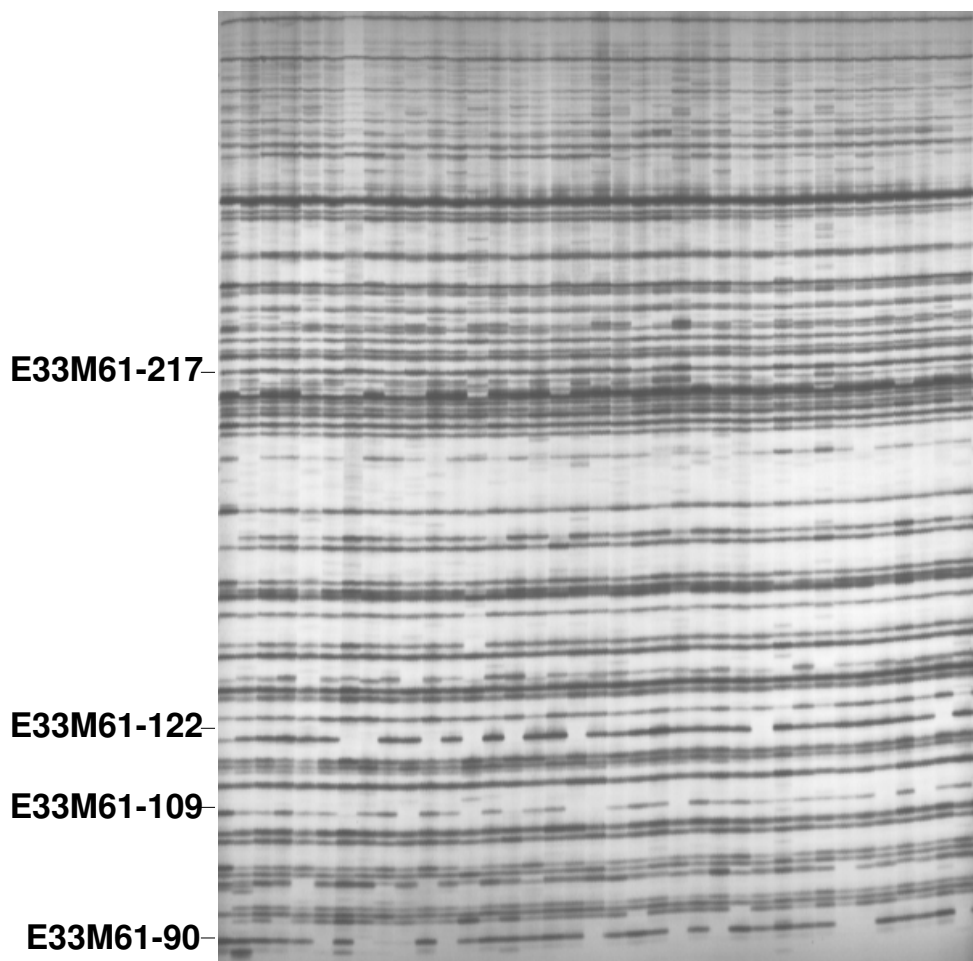


Abbildung 3.8: AFLP-Bandenmuster der Primerkombination E33M61 in der Kartierungspopulation. Polymorphe Marker sind entsprechend gekennzeichnet.

Zwischen der Gesamtzahl an Banden und dem Anteil polymorpher Banden konnte keine Korrelation beobachtet werden (Pearson-Korrelation $r = -0,16$, $P = 0,52$). Die meisten Polymorphismen traten bei Kombinationen auf, an denen die *EcoRI*-Primer E36 und E37 beteiligt waren. Der durchschnittliche Polymorphiegrad betrug für diese beiden Primer

13,05 % bzw. 18,98 %. Jedoch konnten weder zwischen den *EcoRI*-Primern noch zwischen den *MseI*-Primern signifikante Unterschiede in ihrem Einfluß auf den Polymorphiegrad nachgewiesen werden (*EcoRI*-Primer: $F = 1.78$, $P = 0.24$; *MseI*-Primer: $F = 0.56$, $P = 0.77$). Die Bezeichnung polymorpher Marker erfolgte nach einem Vorschlag von QI und LINDHOUT (1997), dem zufolge nach Angabe der Kombination die Größe des polymorphen Produkts folgen sollte. Das AFLP-Muster der Primerkombination E33M61 in der Kartierungspopulation ist in Abbildung 3.8 dargestellt, in der auch die polymorphen Marker E33M61-90, E33M61-109, E33M61-122, E33M61-217 gekennzeichnet sind. Sie kartieren zu den Chromosomen 4R, 7R, 2R und 6R.

3.2 Erstellung einer dicht besetzten Genkarte

3.2.1 Spaltungsanalysen

RFLPs

Im Anschluß an das Screening sind für 5 RFLP-Marker Spaltungsanalysen durchgeführt worden. Mit Ausnahme von *XTri25-11* und *Xiag312* zeigten die polymorphen RFLP-Marker keine signifikante Abweichung ($P < 0,05$) von einem Mendelschen kodominanten Erbgang einer F_2 -Population (Tabelle 3.10). Als Ursache für die signifikant abweichende Spaltung von *XTri25-11* ($\chi^2 = 12,462$; $P = 0,002$) konnte nach orthogonaler Zerlegung des χ^2 -Wertes eine Zygotenselektion ermittelt werden ($\chi^2_1 = 4,15$, $P < 0,05$; $\chi^2_2 = 8,31$, $P < 0,01$). Die signifikante Abweichung des χ^2 -Wertes für *Xiag312* ($\chi^2 = 7,027$; $P = 0,030$)

Tabelle 3.10: χ^2 -Analyse und chromosomale Lage der in der Kartierungspopulation polymorphen RFLP-Marker

RFLP-Marker	N [†]	Aufspaltung [‡]	$\chi^2_{1:2:1}$	$P > \chi^2$	Chromosom
<i>Xiag311</i>	73	24:30:19	3,000	0,223	3R
<i>Xiag312</i>	73	10:47:16	7,027	0,030	6R
<i>Xiag313</i>	66	14:38:14	1,515	0,469	6R
<i>Xiag318</i>	62	12:38:12	3,161	0,206	6R
<i>XTri25-11</i>	78	24:48:6	12,462	0,002	1R

[†] Gesamtzahl untersuchter Individuen

[‡] Genotypenklassen in der Reihenfolge *Hom1:Het:Hom2*

ließ sich ebenfalls auf Zygotenselektion zurückführen ($\chi^2_1 = 6,04$; $P < 0,05$), wie auch aus der übermäßig hohen Zahl heterozygoter Genotypen erkennbar wird. Sowohl *XTri25-11* als auch *Xiag312* kartieren jeweils zu einer chromosomalen Region auf Chromosom 1R und 6R, in der eine Reihe weiterer Marker abweichende Spaltungen aufweisen (SENFT 1996).

RAPDs

Eine eindeutige Bonitur mit reproduzierbarem Bandenmuster ließ sich lediglich bei 6 der 19 polymorphen RAPD-Primer (31,6 %) vornehmen. Der bereits von SENFT (1996) beschriebene Marker OP-X4-600 wurde neu evaluiert und zeigt nun eine Kopplung zu Chromosom 7R. Keine der polymorphen Banden zeigt ein von der erwarteten 3:1-Spaltung abweichendes Verhalten ($P < 0,05$). Der auffällige χ^2 -Wert von OP-P15-750 ($\chi^2 = 3,655$; $P = 0,056$) steht in Zusammenhang mit den auf Chromosom 6R gefundenen abweichenden Spaltungsverhältnissen.

Tabelle 3.11: χ^2 -Analyse und chromosomale Lage polymorpher RAPD-Marker

RAPD-Marker	N	Aufspaltung [†]	$\chi^2_{3:1}$	$P > \chi^2$	Chromosom
OP-O3-1400	71	48:23	2,070	0,150	6R
OP-O6-1100	63	44:19	0,894	0,344	2R
OP-P11-1050	51	40:11	0,320	0,571	6R
OP-P15-750	57	49:8	3,655	0,056	6R
OP-X4-600	72	60:12	2,667	0,102	7R
OP-X4-850	68	48:20	0,706	0,401	6R

[†] Phänotypenklassen in der Reihenfolge *Bande: Null-Allel*

SSR-Marker

Aus den Analysen mit SSR-Markern resultierten 15 polymorphe Loci, von denen SCM5a-650, SCM306 und WMS44 einen dominanten Erbgang aufwiesen (Tabelle 3.12). Diesen Markern liegt kein Mikrosatelliten-Polymorphismus zugrunde, welcher in einer spaltenden F_2 -Population drei unterscheidbare Genotypen liefert. Vielmehr sind diese 3 Marker als sequenzspezifische STS(sequence tagged site)-Marker zu bezeichnen. Eine vom erwarteten 1:2:1-Verhältnis signifikant abweichende Spaltung konnte für den SSR-Marker

SCM39 festgestellt werden. Die Störung führte zu einem Ausfall einer Homozygotenklasse, wie er bei einer Gruppe mehrerer Marker auf Chromosom 1R beobachtet wurde (SENF 1996). Auch für SCM39 spricht wie beim RFLP-Marker *XTri25-11* eine Zygotenselektion für die erhebliche Abweichung, wie aus den beiden χ^2 -Einzelkomponenten $\chi^2_1 = 8,96$ ($P < 0,01$) und $\chi^2_2 = 9,48$ ($P < 0,01$) hervorgeht.

Tabelle 3.12: χ^2 -Analyse und chromosomale Lage polymorpher SSR-Marker des Roggens und Weizens. Die mit * gekennzeichneten Marker spalteten dominant und wurden gegen 3:1 getestet.

SSR-Marker	N	Aufspaltung [†]	$\chi^2_{1:2:1}$	$P > \chi^2$	Chromosom
SCM2	62	16:33:13	0,548	0,760	6R
SCM5	60	20:24:16	2,933	0,231	3R
SCM5a-650*	60	46:14	0,089	0,766	4R
SCM28	65	13:41:11	4,570	0,102	6R
SCM39	54	16:38:0	18,444	0,000	1R
SCM40	45	12:21:12	0,200	0,905	7R
SCM43	52	12:27:13	0,115	0,944	2R
SCM69	39	5:22:12	3,154	0,207	2R
SCM86	63	16:33:14	0,270	0,874	7R
SCM138	45	12:22:11	0,067	0,967	5R
SCM180	50	12:25:13	0,040	0,980	6R
SCM304	41	11:23:7	1,390	0,499	6R
SCM306*	64	47:17	0,083	0,773	?
WMS6	73	19:32:22	1,356	0,508	5R
WMS44*	46	39:7	2,348	0,125	6R

[†] Genotypenklassen in der Reihenfolge *Hom1:Het:Hom2*

AFLPs

An das Screening von AFLP-Primerkombinationen schlossen sich Spaltungsanalysen für Primerkombinationen mit dem höchsten Polymorphiegrad an. Aus diesen Kombinationen

(E33M48, E33M59, E33M60, E33M61, E36M59, E36M61, E37M48, E37M49) gingen insgesamt 80 AFLP-Marker hervor (Tabelle 3.13). Drei Marker (E33M60-127, E36M59-355, E37M48-228) wiesen gestörte Spaltungen auf ($P < 0,05$), die in allen Fällen in einer zu hohen Anzahl des Null-Allels begründet lagen. Eine ähnliche Tendenz war bei Marker E33M59-94 ($\chi^2 = 3,429$; $P = 0,064$) zu beobachten. Bei diesen Markern, sowie weiteren 5 Markern ohne gestörte Spaltung war eine Kopplung zu einem der 7 Chromosomen nicht eindeutig nachzuweisen.

Tabelle 3.13: χ^2 -Analyse und chromosomale Lage polymorpher AFLP-Marker. Die mit * gekennzeichneten Marker bestehen aus zwei kosegregierenden Banden

Primer-kombination	Größe (bp)	N	Aufspaltung†	$\chi^2_{3:1}$	$P > \chi^2$	Chromosom
E33M48	115	63	43:20	1,529	0,216	6R
E33M48	119	62	45:17	0,194	0,660	5R
E33M48	129	62	45:17	0,194	0,660	?
E33M48	161	63	49:14	0,259	0,611	6R
E33M48	164	60	44:16	0,089	0,766	2R
E33M48	196	61	51:10	2,410	0,121	6R
E33M48	198	62	45:17	0,194	0,660	7R
E33M48	205	61	48:13	0,443	0,506	4R
E33M48	259	62	48:14	0,194	0,660	2R
E33M48	277	60	46:14	0,089	0,766	7R
E33M48	280	62	46:16	0,022	0,883	7R
E33M48	310	60	46:14	0,089	0,766	7R
E33M48	342	63	46:17	0,132	0,716	2R
E33M48	409	59	48:11	1,271	0,260	1R
E33M59	94	56	36:20	3,429	0,064	?
E33M59	116	60	46:14	0,089	0,766	2R
E33M59	123	59	52:7	5,429	0,020	7R
E33M59	128	58	42:16	0,207	0,649	3R
E33M59	178	60	45:15	0,000	1,000	6R
E33M59	294	54	40:14	0,025	0,875	2R
E33M59	387	55	46:9	2,188	0,139	6R
E33M59	395	56	41:15	0,095	0,758	1R
E33M60	99	61	45:16	0,049	0,824	2R
E33M60	123	61	47:14	0,137	0,712	3R

Fortsetzung von **Tabelle 3.13:**

Primer- kombination	Größe (bp)	N	Aufspaltung†	$\chi^2_{3:1}$	$P > \chi^2$	Chromosom
E33M60	127	57	35:22	5,620	0,018	?
E33M60	131	62	49:13	0,538	0,463	7R
E33M60	137	58	40:18	1,126	0,289	2R
E33M60	259	61	43:18	0,661	0,416	5R
E33M60	285	61	48:13	0,443	0,506	?
E33M60	344	62	45:17	0,194	0,660	2R
E33M61	90	57	40:17	0,708	0,400	4R
E33M61	109	55	42:13	0,055	0,815	7R
E33M61	122	58	45:13	0,207	0,649	2R
E33M61	217	59	46:13	0,277	0,599	6R
E36M59	83	55	41:14	0,006	0,938	5R
E36M59	116	55	42:13	0,055	0,815	2R
E36M59	120	55	40:15	0,152	0,697	4R
E36M59	145	55	45:10	1,364	0,243	6R
E36M59	150	55	39:16	0,491	0,484	5R
E36M59*	201,207	55	44:11	0,733	0,392	6R
E36M59	232	53	40:13	0,006	0,937	2R
E36M59	285	55	36:19	2,673	0,102	6R
E36M59	347	57	44:13	0,146	0,702	2R
E36M59	355	55	33:22	6,600	0,010	?
E36M59	397	54	40:13	0,006	0,937	7R
E36M61	146	66	45:21	1,636	0,201	5R
E36M61	147	65	46:19	0,621	0,431	3R
E36M61	150	64	48:16	0,000	1,000	5R
E36M61	190	64	47:17	0,083	0,773	7R
E36M61	191	65	49:16	0,005	0,943	?
E36M61	192	65	48:17	0,046	0,830	?
E36M61	230	63	52:11	1,910	0,167	7R
E36M61	250	64	47:17	0,083	0,773	3R
E36M61	263	63	46:17	0,132	0,716	5R
E36M61	290	61	46:15	0,005	0,941	4R
E36M61	292	64	49:15	0,083	0,773	2R
E36M61	325	64	50:14	0,333	0,564	6R

Fortsetzung von **Tabelle 3.13:**

Primer-kombination	Größe (bp)	N	Aufspaltung†	$\chi^2_{3:1}$	$P > \chi^2$	Chromosom
E36M61	346	63	45:18	0,429	0,513	5R
E36M61	370	65	46:19	0,621	0,431	2R
E37M48	84	65	46:19	0,621	0,431	5R
E37M48	91	65	51:14	0,415	0,519	1R
E37M48	145	65	47:18	0,251	0,616	2R
E37M48	149	65	43:22	2,713	0,100	6R
E37M48	153	65	50:15	0,128	0,720	7R
E37M48	165	63	45:18	0,429	0,513	2R
E37M48	197	63	51:12	1,190	0,275	3R
E37M48	204	65	54:11	2,262	0,133	?
E37M48	213	64	45:19	0,750	0,386	5R
E37M48	222	64	49:15	0,083	0,773	1R
E37M48	228	59	35:24	7,734	0,005	?
E37M48	248	64	48:16	0,000	1,000	5R
E37M48	274	63	48:15	0,048	0,827	2R
E37M48	302	65	48:17	0,046	0,830	2R
E37M48	306	63	43:20	1,529	0,216	?
E37M49	130	63	46:17	0,132	0,716	2R
E37M49	151	64	46:18	0,333	0,564	2R
E37M49	156	61	47:14	0,137	0,712	7R
E37M49	157	64	48:16	0,000	1,000	5R
E37M49	189	61	47:14	0,137	0,712	6R
E37M49*	281,284	63	49:14	0,259	0,611	7R

† Phänotypenklassen in der Reihenfolge *Bande: Null-Allel*

3.2.2 Kopplungsanalysen

Spaltungs- und Kopplungsdaten von morphologischen Markern, Isoenzym-, RFLP- und RAPD-Markern in der F_2 -Kartierungspopulation, die bereits vor Beginn dieser Arbeit vorlagen, basieren auf den Untersuchungen von SENFT (1996). Dort finden sich ebenfalls weitere Erklärungen zur Nomenklatur der Marker-Loci sowie zur Kartendarstellung. Die mit dem Programm LINKAGE-1 (SUITER *et al.* 1983) erzielten Ergebnisse der

Zweipunkt-Analyse der im Rahmen dieser Dissertation entstandenen Marker sind im Anhang aufgeführt. Die Zweipunkt-Analyse für den gesamten, 218 Loci umfassenden Datensatz mit dem Programm MAPMAKER 3.0b (LANDER *et al.* 1987) unter Vorgabe eines LOD-Grenzwertes von 3.0 und eines maximalen Markerabstands von 30 cM führte zu 15 Kopplungsgruppen und 21 ungekoppelten Loci. Nach Zuordnung von Kopplungsgruppen zu Chromosomen aufgrund der bekannten Position einiger Marker (SENF 1996) verblieben 4 Kopplungsgruppen. Die Anordnung der Marker zueinander wurde durch Mehrpunkt-Analyse ebenfalls mit MAPMAKER ermittelt. Eine Gesamtübersicht wird in Tabelle 3.14 gegeben.

Tabelle 3.14: Übersicht über Zahl und Art der Marker, genetische Dichte und Länge einzelner Roggen-Chromosomen und Kopplungsgruppen der Kartierungspopulation, modifiziert nach SENFT (1996)

Markertyp	Chromosom							ungekopp. Gruppen	Gesamt
	1R	2R	3R	4R	5R	6R	7R		
morphologische	0	0	0	0	1	0	0	0	1
Isoenzyme	1	1	1	0	2	3	2	0	10
RFLPs	6	17	9	8	6	10	6	6	68
RAPDs	2	6	4	3	1	6	4	3	29
SSRs [†]	1	2	1	1	2	5	2	0	14
AFLPs	4	18	5	6	12	12	13	4	74
Gesamt	14	44	20	18	24	36	27	13	196
Länge (cM)	93,5	282,5	122,4	144,1	123,3	270,1	186,7	121,2	1344,1
Ø Abstand (cM)	6,7	6,4	6,1	8,0	5,1	7,5	6,9	9,3	6,9

[†] einschließlich SCM5a-650, WMS44

Es ist ersichtlich, daß die Gesamtlänge des mit Markern abgedeckten Bereichs, verglichen mit dem Stand der Kartierungsarbeiten bei SENFT (1996) von 759,4 cM auf 1344,1 cM nahezu verdoppelt werden konnte, während der durchschnittliche Markerabstand von 8,2 cM auf 6,9 cM sank. Zwischen der Gesamtzahl an Markern pro Chromosom und dessen Länge besteht eine positive Beziehung ($r = 0,95$), jedoch korreliert eine Zunahme der

Marker auf einem Chromosom nicht mit einer Verkleinerung der Markerabstände ($r = -0,01$).

In den folgenden Abschnitten wird auf die einzelnen Chromosomen sowie auf nicht chromosomal zugeordnete Kopplungsgruppen näher eingegangen. Die vermutliche Lage der Centromere der einzelnen Chromosomen, die als schraffierte Balken dargestellt sind, wurde nach DEVOS *et al.* (1993b) ermittelt, wobei der kurze Arm nach oben und der lange Arm nach unten zeigt. Kartenabstände, die auf eine signifikante Kopplung zurückgehen, aber mehr als 30 cM betragen, sind in den dargestellten Chromosomen als gestrichelte Linien eingezeichnet. Marker, die eine abweichende Spaltung zeigen, sind mit einem Stern versehen worden.

Chromosom 1R

Dieses Chromosom konnte im Vergleich zu SENFT (1996) nur unwesentlich mit weiteren Markern angereichert werden, besonders der lange Arm ist noch unzureichend mit Markern besetzt. Der zusätzliche Einbau eines RFLP-Markers, eines SSR-Markers und von 4 AFLP-Markern führte zu einem Anstieg der Gesamtlänge von 59,9 cM auf 93,5 cM. Eine Kopplung zwischen der Gruppe *Xiag95/Xiag229b/E37M48-91* und dem RAPD-Marker OP-R2-470 war bei einem LOD-Wert von 3.0 nicht nachzuweisen, jedoch war aus vorhergehenden Arbeiten (PHILIPP *et al.* 1994) die Position von *Xiag95* auf 1RS bekannt. Die mit einem * versehenen Marker zeigen eine gestörte Spaltung. Mögliche Ursachen für die davon betroffenen Gruppe, die das Centromer einschließt, wurden bereits von SENFT (1996) diskutiert.

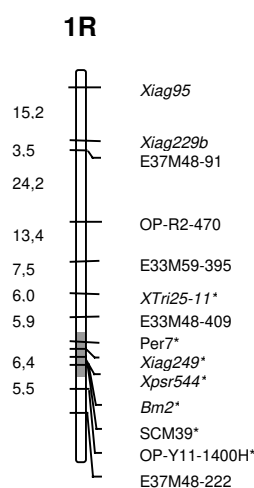


Abbildung 3.9: Kopplungskarte des Chromosoms 1R

Chromosom 2R

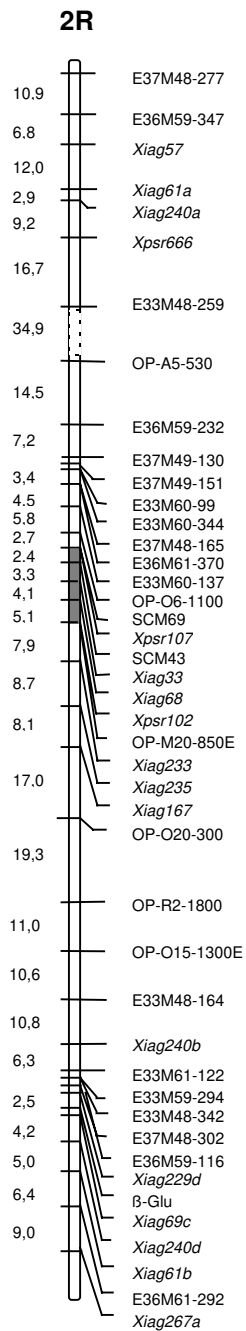


Abbildung 3.10: Kopplungskarte des Chromosoms 2R

Die Kartierung des Chromosoms 2R konnte von allen Chromosomen am weitesten vorangetrieben werden. Während sich nach SENFT (1996) dieses Chromosom aus 3 Kopplungsgruppen zusammensetzte, konnte die Kopplungsgruppe des kurzen Arms mit der mittleren Kopplungsgruppe bei einem LOD-Wert von 3.0 verknüpft werden, die Orientierung der von SENFT (1996) als „2Ra“ bezeichneten Gruppe ist nun aber entgegengesetzt. Durch Einbau des RAPD-Markers OP-A5-530 wird jedoch der Abstand zur Gruppe E33M48-

259/.../E37M48-277 mit 34,9 cM sehr groß. Die Integration von OP-O20-300 führte hingegen zu einem geringeren Abstand zu der von SENFT (1996) bezeichneten Kopplungsgruppe „2Rc“. Diese Annäherung war ebenfalls mit einem Wechsel der Ausrichtung dieser Gruppe verbunden. Die genetische Länge des Chromosoms wuchs von 155,2 cM auf 282,5 cM. Die von SENFT (1996) gefundene Anordnung wurde im Wesentlichen beibehalten, eine größere Veränderung trat in der Centromer-Region durch Neuauswertung des RFLP-Markers *Xiag68* auf, der nun eine enge Kopplung zu *Xiag33* aufweist, welche mit Untersuchungen von KORZUN *et al.* (1997) übereinstimmt.

Chromosom 3R

Die Gesamtlänge von Chromosom 3 ließ sich von 89,7 cM (SENFT 1996) auf 122,4 cM erweitern. Dieser Anstieg wurde durch Integration eines RFLP-Markers, eines SSR-Markers und von fünf AFLP-Markern erreicht. Der ursprünglich mit 33,6 cM gemessene, große Abstand zwischen *Xiag111b* und *Xmwg932* konnte mit den AFLP-Markern E36M61-147 und E36M61-250 ausgefüllt werden und beträgt jetzt 41,5 cM. Außerdem trat eine kleine Veränderung in der Anordnung der Marker in der Centromer-Region ein, die jedoch aufgrund der sehr kleinen Abstände mit dem vorliegenden Datensatz nicht eindeutig bestimmt werden kann.

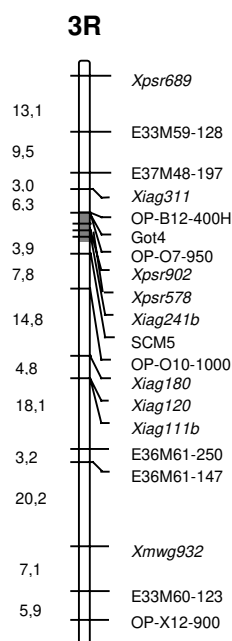


Abbildung 3.11: Kopplungskarte des Chromosoms 3R

Chromosom 4R

Die Karte von Chromosom 4 zeigt als einziges Chromosom zwei Kopplungsgruppen, die unter dem vorgegebenen LOD-Grenzwert von 3.0 nicht verknüpft werden konnten (Abbildung 3.12). Die Positionierung zum langen Chromosomenarm ergibt sich aus der bekannten Lage des RFLP-Markers *Xpsr167*, der sich auf dem zu den 6A/6B/6DS-Chromosomenarmen des Weizens homologen Abschnitt des langen Arms von Chromosom 4R befindet (DEVOS *et al.* 1993b). Mit der Erweiterung dieser Kopplungsgruppe durch zwei AFLP-Marker gelang es jedoch nicht, eine Beziehung zur oben dargestellten Kopplungsgruppe zu finden. Die gesamte Länge des von den Markern abgedeckten Bereichs hat sich im Vergleich zu der von SENFT (1996) beschriebenen „Kopplungsgruppe 4R“ von 72,5 cM auf 144,1 cM nahezu verdoppelt.

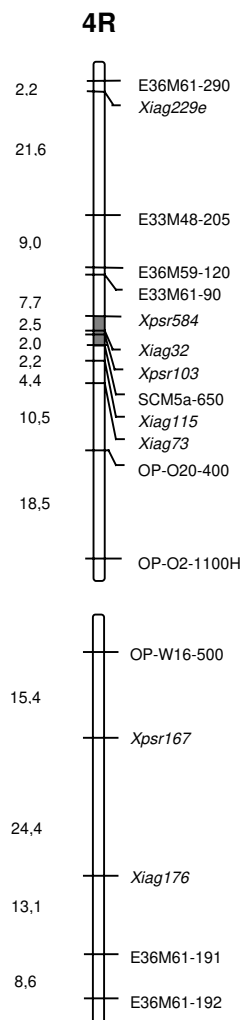


Abbildung 3.12: Kopplungskarte des Chromosoms 4R

Chromosom 5R

Von Chromosom 5R konnte insbesondere der kurze Arm mit Markern dicht kartiert werden. Im Wesentlichen sind daran AFLP-Marker beteiligt, der SSR-Marker SCM138 schließt den kurzen Arm des Chromosoms ab. Die AFLP-Marker, die sich dort über einen Bereich von etwa 18 cM erstrecken, lassen eine deutliche Clusterbildung erkennen, die sich aber nicht auf eine oder wenige Primerkombinationen zurückführen läßt. Die AFLP- und SSR-Marker bewirken eine Zunahme der genetischen Länge des Chromosoms 5R von 78,5 cM (SENFT 1996) auf 123,3 cM. Mit 5,1 cM wird von allen Chromosomen der dichteste mittlere Markerabstand erreicht. Die Anordnung der *Xpsr*-RFLP-Marker wurde, anders als in SENFT (1996) entsprechend ihrer bekannten Position (*Xpsr628* und *Xpsr929* auf 5RS, *Xpsr360* auf 5RL; DEVOS *et al.* 1993) vorgenommen. Auch hier sind aufgrund der dichten Abstände zwischen den Markern mehrere Anordnungen mit ähnlicher Wahrscheinlichkeit möglich. Eine genetische Kopplung zur Kopplungsgruppe Aco2/WMS6/E37M49-4 konnte bei einem minimalen LOD-Wert von 3.0 nicht beobachtet werden, es ist jedoch bekannt, daß sowohl Aco2 als auch WMS6 auf dem zu den Weizen-Chromosomenarmen 4BL und 4DL homologen Segment von 5RL (DEVOS *et al.* 1993b; V. KORZUN, pers. Mitteilung) liegen.

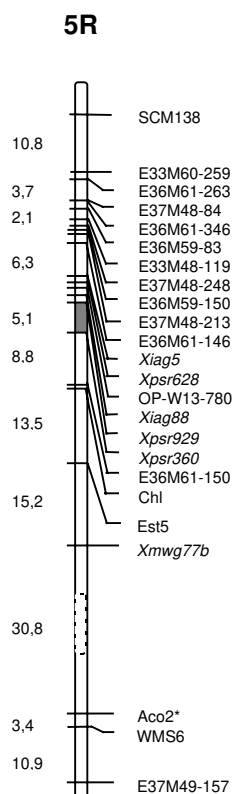


Abbildung 3.13: Kopplungskarte des Chromosoms 5R

Chromosom 6R

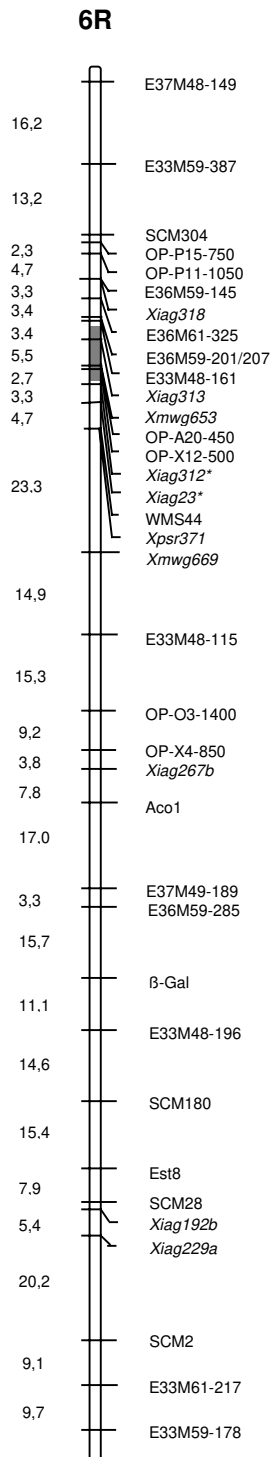


Abbildung 3.14: Kopplungskarte des Chromosoms 6R

Auch die Kopplungskarte von Chromosom 6R ist, verglichen mit der „Kopplungsgruppe 6R“ (SENFT 1996) mit zusätzlichen 25 Markern erheblich erweitert worden (Abbildung 3.14). Mit Hilfe des SSR-Markers SCM180 konnte die bei SENFT (1996) bestehende

Lücke zwischen den Isoenzym-Markern β -Gal und Est8 geschlossen werden und somit eine einzige Kopplungsgruppe realisiert werden. Zu Chromosom 6R kartierten sowohl die meisten SSR-Marker (SCM2, SCM28, SCM180, SCM304, WMS44) als auch 4 der neu hinzugekommenen RAPD-Marker. Neben 4 weiteren RFLP-Markern sind 12 AFLP-Marker integriert worden. Der Anstieg der Länge auf 270,1 cM wurde vor allem durch AFLPs bedingt. Die Lage des Centromers war nicht eindeutig zu ermitteln, es dürfte sich aber zwischen dem Marker *Xpsr371* (6RL; DEVOS *et al.* 1993b) und dem im vermutlich homöologen Abschnitt von Chromosom 6H der Gerste liegenden Marker *Xmwig653* (Graingenes Database) befinden.

Chromosom 7R

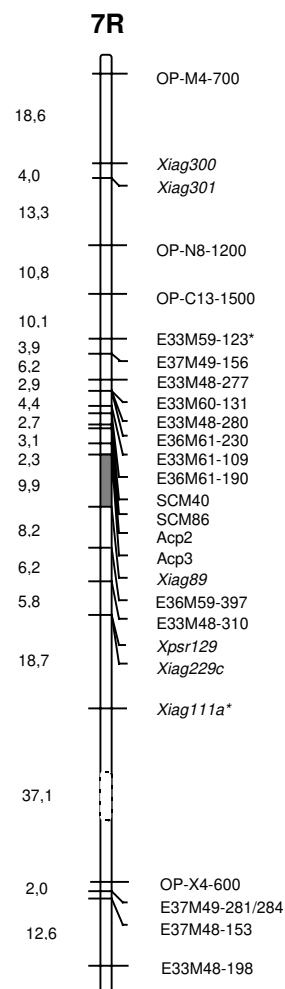


Abbildung 3.15: Kopplungskarte des Chromosoms 7R

Das Chromosom 7R ist insbesondere mit AFLP-Markern im Bereich des Centromers und in der distalen Region des langen Arms angereichert worden. Die dort liegenden 4 Marker

sind zwar lose (37,1 cM), aber signifikant mit *Xiag111a* gekoppelt. Auf die ungefähre Lage des Centromers konnte aufgrund der bekannten Positionen der Marker *Acp2*, *Acp3* (7RS; SALINAS und BENITO 1984) und *Xpsr129* (7RL; ROGNLI *et al.* 1992) geschlossen werden. Auch *Xiag89* befindet sich nach KORZUN *et al.* (1997) auf dem langen Arm, so daß das Centromer zwischen *Xiag89* und den *Acp*-Loci liegen dürfte. Die gesamte Kopplungsgruppe umfaßt 27 Marker mit einer Länge von 186,7 cM.

Kopplungsgruppen ohne chromosomale Zuordnung

Bei einer Signifikanzgrenze von LOD 3.0 für die Zweipunkt-Berechnung wurden weitere vier Kopplungsgruppen gebildet, die bisher keinem der Chromosomen zugeordnet werden konnten. Gruppe I zeigte zwar bei einem LOD-Wert von 2,5 Kopplung zu Chromosom 6R, eine Einordnung war jedoch nicht möglich. Die schwache Beziehung der Gruppe II zu 6RS, die SENFT (1996) feststellte, konnte nicht bestätigt werden. Die aus 3 AFLP-Markern bestehende Kopplungsgruppe III kann aufgrund gestörter Spaltungen nur unter Vorbehalt gelten, weil sie alle dominant spalten.

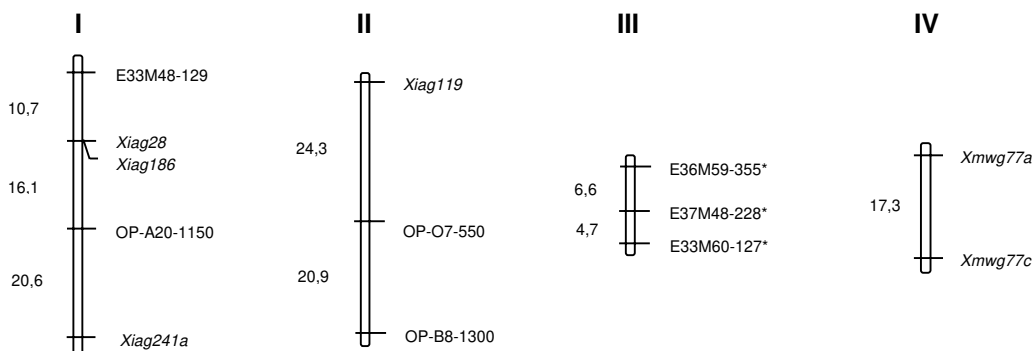


Abbildung 3.16: Chromosomal nicht zuzuordnende Kopplungsgruppen

3.2.3 Verbundene Kopplungskarten für die Chromosomen 5R und 6R

Markerdaten aus anderen spaltenden Nachkommenschaften sind gemeinsam mit Daten der Kartierungspopulation mit Hilfe des Programms JOINMAP 1.4 (STAM 1993) verrechnet worden. Das setzt voraus, daß mindestens 2 Marker sowohl für die Kartierungspopulation als auch für mindestens eine der anderen Nachkommenschaften polymorph sind. Solche Marker werden als „Ankermarker“ bezeichnet. Die Verbindung von Kopplungskarten gelingt um so besser, je mehr gemeinsame Ankermarker vorliegen. Ankermarker für die Zusammenführung von Kopplungsgruppen aus PHILIPP (1992) und der hier verwendeten Kartierungspopulation waren nur für die Chromosomen 5R und 6R vorhanden. Außerdem wurden von Dr. P. Wehling (Bundesanstalt für Züchtungsforschung, Groß-Lüsewitz)

Daten von F_2 -Populationen zur Verfügung gestellt, in denen neben Isoenzym-Loci das für die Vernalisation benötigte Gen *Vrn* spaltete.

Berechnungen des gleichen Datensatzes mit MAPMAKER und JOINMAP legten zum Teil erhebliche Unterschiede in der Länge der Kopplungsgruppe offen. Dabei war die von JOINMAP 1.4 ermittelte Gesamtdistanz immer geringer als die von MAPMAKER, und zwar unabhängig von der Kartierungsfunktion. Beispielsweise beträgt die Länge des Chromosoms 5R unter Verwendung der Kosambi-Funktion nach Berechnung mit MAPMAKER 123 cM, mit JOINMAP 1.4 kommen 84 cM zustande. Die jüngste Version JOINMAP 2.0, die größere Eingriffsmöglichkeiten für den Nutzer bietet, berechnet eine Kartenlänge von 132 cM, allerdings mit der Haldane-Funktion (Prof. Dr. W.E. WEBER, Martin-Luther-Universität Halle, pers. Mitteilung). Die Berechnung auf der Basis der Kosambi-Funktion dürfte aber mit der von MAPMAKER errechneten Länge eine bessere Übereinstimmung zeigen. Ein Vergleich zweier Karten, von denen eine mit MAPMAKER und die andere mit JOINMAP 1.4 erstellt worden ist, erscheint jedoch hinsichtlich der Bewertung von Kartenabständen nicht sinnvoll. Hingegen treten in der Anordnung der Marker über eine größere Strecke nur geringfügige Unterschiede auf.

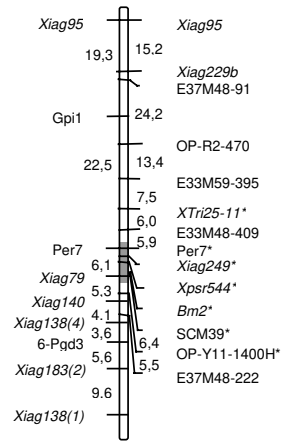
In der Abbildung 3.17, in der alle Kopplungsinformationen zusammengetragen worden sind, wurden deshalb nur die relativen Positionen der von JOINMAP integrierten Marker eingefügt, die vom Programm errechneten Abstände blieben dabei weitgehend unberücksichtigt. Eine eindeutige Kartierung der Loci *Est3*, *Hs* und *Vrn* auf Chromosom 5R war aufgrund der wenigen Kopplungsbeziehungen nicht möglich. Das Gen *Vrn* wurde von JOINMAP 1.4 zwischen die RFLP-Marker am Centromer eingeordnet. Falls es sich um das gleiche Gen wie *Sp1* (PLASCHKE *et al.* 1992) handelt, müßte es aber distal vom Centromer liegen.

Weitere Kopplungsgruppen aus den Arbeiten von PHILIPP (1992), die nicht in die JOINMAP-Berechnungen eingingen, sind auf der linken Seite der Chromosomen sichtbar, wobei gegebenenfalls die ungefähre Lage berücksichtigt ist. Es handelt sich dabei um Kopplungsgruppen der Chromosomen 1R, 4R, 5R und 7R. Eine weitere, ausschließlich mit RFLP-Markern besetzte Kopplungsgruppe (V) konnte bisher keinem Chromosom zugeordnet werden. Über die mögliche chromosomale Lage liegen zur Zeit widersprüchliche Informationen vor. Der in der Kopplungsgruppe befindliche RFLP-Marker *Xiag27* ist von KORZUN *et al.* (1997) auf 2R kartiert worden, während sich der Marker *Xiag32* in der hier vorgestellten Karte auf Chromosom 4R befindet. Der Marker *Xiag120* wiederum liegt auf der Karte von KORZUN *et al.* (1997) auf 4R, auf der Karte von SENFT und WRICKE (1996) auf Chromosom 3R. Da es sich in den genannten Fällen wahrscheinlich nicht um orthologe RFLP-Loci handelt, sind weitere Experimente zur Klärung dieser Frage nötig.

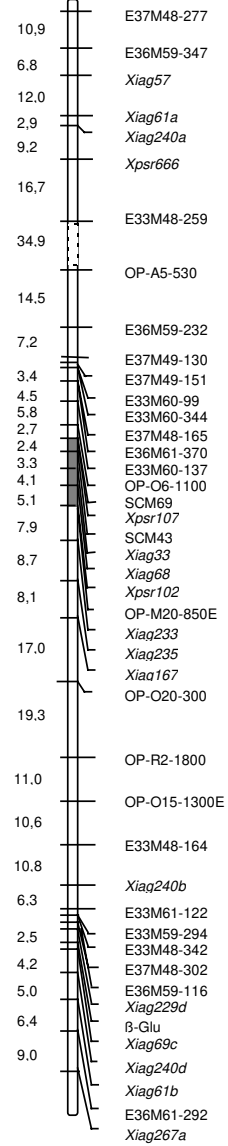
Die vorliegende Genkarte des Roggens einschließlich der Markerinformationen aus PHILIPP (1992) umfaßt insgesamt 226 genetische Marker, darunter 2 morphologische Marker, 19 Isoenzym-Loci, 88 RFLP-Marker, 29 RAPDs, 14 SSRs und 74 AFLPs. Die Gesamtlänge bemißt sich auf etwa 1380 cM. Die Kartenpositionen der Selbstinkompatibilitätsloci *S* und *Z* sowie des Mehltaresistenzgens *Pm* sind in SENFT und WRICKE (1996) wiedergegeben.

Abbildung 3.17: Auf den folgenden 2 Seiten sind die aus vorhergehenden Arbeiten (PHILIPP 1992, SENFT 1996) gewonnenen sowie die hier erarbeiteten Kopplungsdaten zu einer gemeinsamen Genkarte des Roggens zusammengefaßt. Kopplungsgruppen, die bisher nicht zugeordnet werden konnten, sind mit römischen Zahlen versehen worden, weitere nicht integrierbare Marker sind auf der linken Seite eines Chromosoms dargestellt.

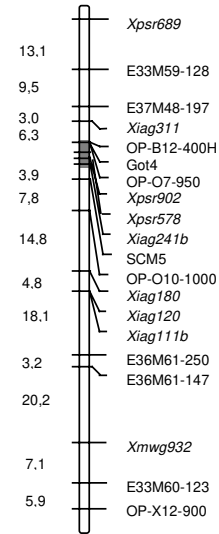
1R



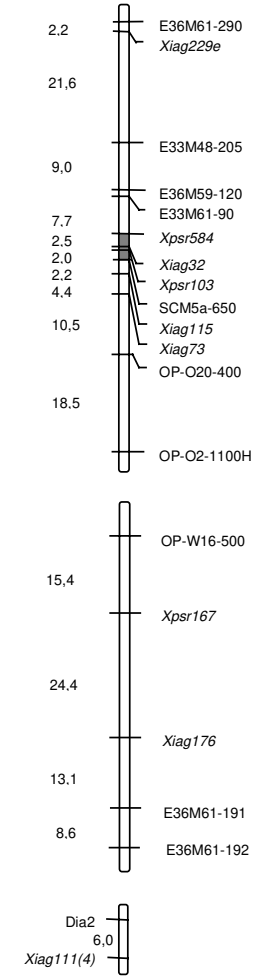
2R

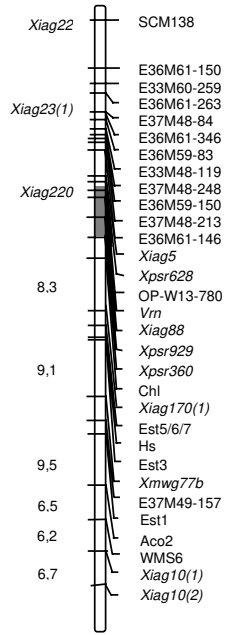
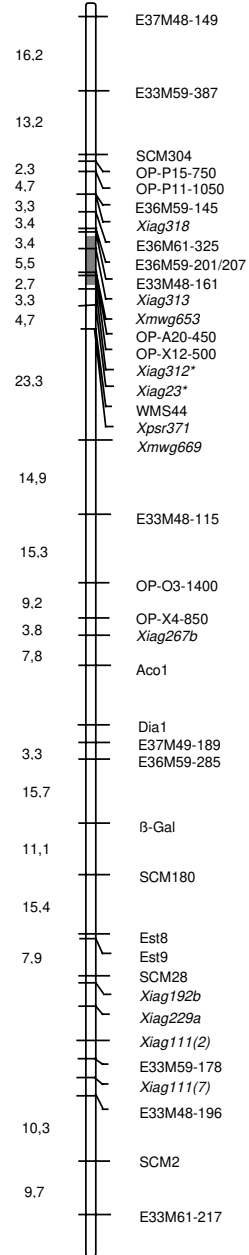
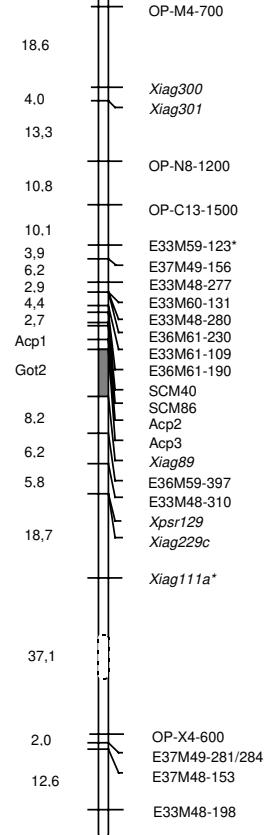
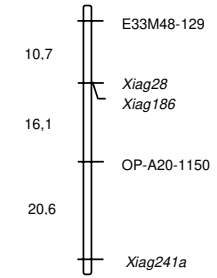
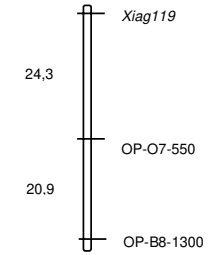
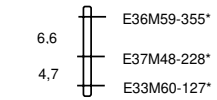
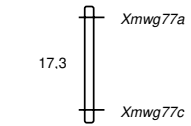
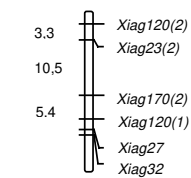


3R



4R



5R**6R****7R****I****II****III****IV****V**

3.3 Untersuchungen zum Polymorphiegrad molekularer Marker

Das Ausmaß an Polymorphismus von SSR-, RFLP- und RAPD-Markern wurde an Einzelpflanzen der Populationsorten `Halo´ und `Danko´ ermittelt. Dabei ist darauf geachtet worden, daß die dafür herangezogenen Marker auf unterschiedlichen Chromosomen oder Chromosomenarmen liegen. Aus den vorliegenden SSR-Markern des Roggens sind SCM2, SCM9, SCM109 und SCM138 ausgewählt worden. Für diese Untersuchungen lagen zwischen 51 und 76 Pflanzen vor. Von RAPD-Markern ist für 5 Loci aus der Genkarte mit den Primern OP-C13, OP-O20, OP-R2, OP-W13 und OP-X12 aus einer Stichprobe von 38 bis 50 Individuen der Polymorphiegrad bestimmt worden. Für die RFLP-Analysen war aufgrund unzureichender DNA-Qualität, besonders in der Sorte `Danko´, der Umfang des Pflanzenmaterials geringer. Auch die Zahl der RFLP-Marker wurde auf die 3 Roggen-DNA-Sonden *Xiag33*, *Xiag95* und *Xiag318* beschränkt. Während für die Sonden *Xiag33* und *Xiag318* zwischen 47 und 53 Pflanzen der Sorte `Halo´ und 30 bis 32 Pflanzen der Sorte `Danko´ ausgewertet worden sind, lagen für die Sonde *Xiag95* zwischen 24 und 26 Pflanzen der Sorte `Danko´ und 31 bis 33 Pflanzen der Sorte `Halo´ vor. Falls möglich wurden mindestens zwei der Restriktionsenzyme *DraI*, *EcoRI*, *EcoRV* und *HindIII* für jede Sorte verwendet.

3.3.1 RFLPs

In der Tabelle 3.15 sind Allelzahl, die geschätzten Allelfrequenzen und deren Varianzen von RFLP-Sonden wiedergegeben. Daraus geht hervor, daß in Populationsorten multiple Allelie häufig anzutreffen ist. Falls mehr als 3 Allele beobachtet wurden, war mindestens ein seltenes Allel vertreten. So lagen beispielsweise bei der Sonden/Enzym-Kombination *Xiag33/EcoRI* neben einem vorherrschenden Allel (84 %) ein Allel mit etwa 10 % und drei seltene Allele (< 4 %) vor. Ein Vergleich der Schnittstellen-Polymorphismen zweier Enzyme an einem RFLP-Locus eines Individuums weist in der Mehrheit der Fälle auf eine Übereinstimmung zwischen den dabei aufgedeckten Genotypen hin. Sie erfassen demnach den selben Polymorphismus. Beispielsweise zeigt sich beim Vergleich des *DraI*-Musters mit dem *HindIII*-Muster der Sonde *Xiag318* in der Sorte `Halo´, daß bei 35 von 40 Individuen immer bestimmte Allelkombinationen bzw. Genotypen einander entsprechen. Daraus kann geschlossen werden, daß überwiegend Insertions- bzw. Deletionsmutationen für die Variabilität an diesem RFLP-Locus verantwortlich sind. Im Fall von *Xiag33* würde sich der Unterschied zwischen den Restriktionsenzymen durch unterschiedliche Mutationsraten an den jeweiligen Schnittstellensequenzen erklären. Weiterhin geht aus Tabelle 3.15 hervor, daß selbst bei kleinen Individuenzahl (N = 24) die Varianzen der Schätzwerte für die Häufigkeit von RFLP-Allelen sehr gering sind.

Tabelle 3.15: Geschätzte Allelhäufigkeiten \hat{p}_i und deren Varianzen $V(\hat{p}_i)$ an ausgewählten RFLP-Loci des Roggens in den Populationssorten 'Halo' und 'Danko'

RFLP-Marker	'Halo'					'Danko'				
	Enzym	N [†]	k [‡]	\hat{p}_i	$V(\hat{p}_i)$	Enzym	N [†]	k [‡]	\hat{p}_i	$V(\hat{p}_i)$
<i>Xiag33</i>	<i>EcoRI</i>	47	5	0,0106	0,0001	<i>EcoRI</i>	32	2	0,1250	0,0017
				0,0213	0,0002				0,8750	0,0017
				0,0319	0,0003				0,0167	0,0003
	<i>HindIII</i>	49	2	0,0957	0,0009	<i>EcoRV</i>	30	3	0,0333	0,0005
				0,8404	0,0014				0,9500	0,0008
				0,0408	0,0004				0,0408	0,0004
<i>Xiag95</i>	<i>DraI</i>	31	4	0,9592	0,0004	<i>EcoRI</i>	26	2	0,0323	0,0005
				0,4194	0,0039				0,5000	0,0048
				0,1774	0,0024				0,5000	0,0048
	<i>HindIII</i>	33	4	0,3709	0,0038	<i>HindIII</i>	24	6	0,0833	0,0016
				0,4697	0,0038				0,0208	0,0004
				0,1667	0,0021				0,0833	0,0016
<i>Xiag318</i>	<i>DraI</i>	53	3	0,1250	0,0023	<i>EcoRV</i>	31	2	0,0625	0,0012
				0,3485	0,0034				0,6250	0,0049
				0,0151	0,0002				0,6250	0,0049
	<i>HindIII</i>	47	4	0,3208	0,0021	<i>HindIII</i>	47	4	0,5484	0,0040
				0,4717	0,0024				0,4516	0,0040
				0,2075	0,0016				0,1170	0,0011
				0,6277	0,0025					
				0,0213	0,0002					
				0,2340	0,0019					

† Anzahl untersuchter Individuen

‡ Anzahl Allele

3.3.2 RAPDs

Für die Häufigkeitsschätzung der Allele von RAPD-Markern wurden polymorphe und kartierte Amplifikationsprodukte ausgewertet. Eine kodominante Ausprägung dieser RAPD-Loci konnte auch in den beiden Populationssorten nicht beobachtet werden. Aus der Frequenz der rezessiven, das Null-Allel (-) tragenden Genotypen ist die relative Anzahl

des Null-Allels ermittelt und daraus die Häufigkeit des für die Bandenausprägung zuständigen Allels (+) geschätzt worden (Tabelle 3.16). Bei einer Anzahl von etwa 50 Individuen nähert sich der Schätzwert für die Varianz asymptotisch bereits eng an deren Erwartungswert an (BIEBLER und JÄGER 1996). Aus diesem Grund können die in Tabelle 3.16 angegebenen Varianzen als relativ unverzerrt angesehen werden. Die Zuverlässigkeit eines Schätzwertes für das +-Allel von 1, wie im Fall des Locus OP-W13-780, wird stark davon abhängen, ob die für die Schätzung der Häufigkeit zugrunde liegenden populationsgenetischen Voraussetzungen erfüllt sind, während ein Schätzwert von 0 aufgrund des höheren Informationsgehalts des Null-Allels robuster sein wird.

Tabelle 3.16: Geschätzte Frequenz (\hat{p}_i) und Varianz ($V(\hat{p}_i)$) des +-Allels von kartierten RAPD-Loci in den Populationssorten 'Halo' und 'Danko'.

RAPD-Primer	Größe des PCR-Produkts [bp]	'Halo'			'Danko'		
		N	\hat{p}_i	$V(\hat{p}_i)$	N	\hat{p}_i	$V(\hat{p}_i)$
OP-C13	1500	38	0,2929	0,0033	43	0,4717	0,0042
OP-O20	400	46	0,6388	0,0047	45	0,5784	0,0046
OP-R2	470	45	0,1056	0,0011	48	0,0000	0,0000
OP-W13	780	45	1,0000	0,0056	48	1,0000	0,0052
OP-X12	500	50	0,2929	0,0025	46	0,4102	0,0035

3.3.3 SSRs

Aufgrund der zu erwartenden geringen Größenunterschiede zwischen den Amplifikationsprodukten (Marker-Allelen), die gegebenenfalls 2 bp betragen können, sind die Amplifikationsreaktionen und die Auftrennung der Produkte auf einem ALF Express-Sequenziergerät (Pharmacia, Freiburg) im Rahmen einer Kooperation mit dem Resistenzlabor der Saaten-Union, Hovedissen, von Dr. C. Knaak durchgeführt worden. Durch das Mitlaufen mehrerer Größenstandards in einem Gel ist in den meisten Fällen eine exakte Bestimmung der Größe des Amplifikats ermöglicht worden. Nach Detektion des mit einem fluoreszierenden Farbstoff gekoppelten PCR-Produkts mit Hilfe eines Lasers wurde die Auswertung mittels einer Software vorgenommen. Als Daten wurden die Genotypen der Pflanzen einer jeden Sorte und die Angabe der Allelgröße übermittelt. Die Abbildung 3.18 zeigt eine Darstellungsmöglichkeit einer Auswertung mit dem ALF am Beispiel der Sorte

‘Halo’ und des SSR-Markers SCM109 (a) sowie zum Vergleich ein 3,5%iges Metaphor-Agarosegel nach Analyse von Pflanzen der Sorte ‘Danko’ mit dem SSR-Marker SCM2 (b). Es wird daraus deutlich, daß für die Schätzung von Allelhäufigkeiten die Auftrennung in Agarose nur bedingt geeignet ist. Das bei heterozygoten Genotypen gelegentlich zu beobachtende Auftreten einer weiteren Bande (Heteroduplex) auf Agarosegelen kann die Auswertung zusätzlich erschweren. Hingegen bereitet die Auftrennung von radioaktiv oder nichtradioaktiv markierten Amplifikaten auf denaturierenden Polyacrylamid-Gelen der Bonitur keine Probleme.

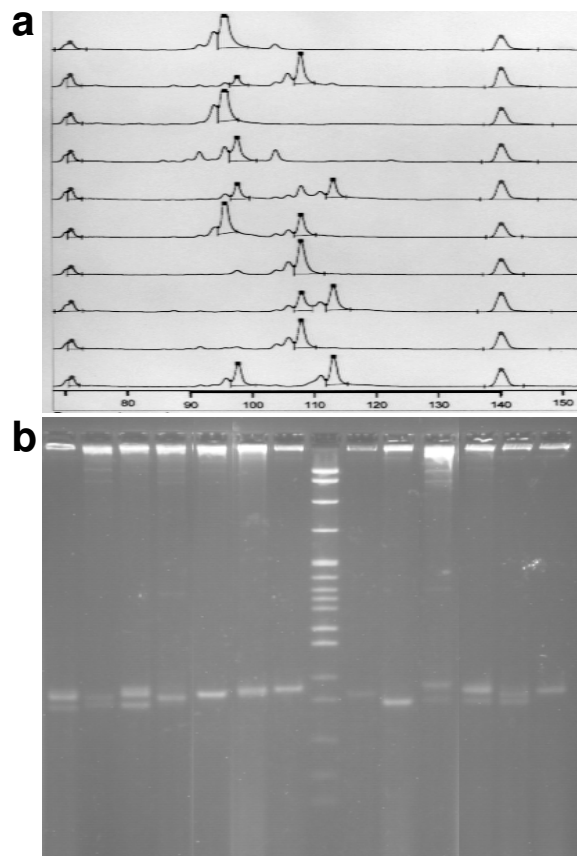


Abbildung 3.18: Analyse von SSR-Markern in Populationssorten des Roggens. a) Spektrogramm nach Auftrennung von SSR-Allelen des Markers SCM109 in der Sorte ‘Halo’ auf einem ALF-Sequenziergerät. Größenstandards sind bei 70 bp und 140 bp zu erkennen. b) Auftrennung von SSR-Allelen des Markers SCM2 in der Sorte ‘Danko’ auf einem 3,5%igen Metaphor-Agarosegel. Größenmarker: pBR322/*MspI*

Die Allelzahl, Allelfrequenzen, Varianzen von 4 SSR-Markern in den beiden Sorten ‘Halo’ und ‘Danko’ sind in Tabelle 3.17 aufgeführt. Werden beide Sorten zusammen betrachtet, sind insgesamt 3 bis 10 Allele je Locus nachgewiesen worden. Da die Schätzung der

Allelhäufigkeiten aus jeweils mehr als 100 Allelen (2N) vorgenommen wurde, liegen die Varianzen im Durchschnitt noch niedriger als die für die RFLPs und

Tabelle 3.17: Anzahl Allele, Allelhäufigkeiten (\hat{p}_i) und deren Varianz ($V(\hat{p}_i)$) von SSR-Markern des Roggens in den Populationssorten 'Halo' und 'Danko'

SSR-Marker	'Halo'				'Danko'			
	N	k	\hat{p}_i	$V(\hat{p}_i)$	N	k	\hat{p}_i	$V(\hat{p}_i)$
SCM2	76	3	0,0329	0,0002	52	3	0,2885	0,0020
			0,2763	0,0013			0,2692	0,0019
			0,6908	0,0014			0,4423	0,0024
SCM9	57	5	0,1579	0,0012	54	5	0,0278	0,0003
			0,0175	0,0002			0,1759	0,0013
			0,0175	0,0002			0,0833	0,0007
			0,0439	0,0004			0,2500	0,0017
			0,7632	0,0016			0,4630	0,0023
SCM109	76	7	0,1710	0,0009	51	10	0,0588	0,0005
			0,2303	0,0012			0,1471	0,0012
			0,0395	0,0002			0,0392	0,0004
			0,4013	0,0016			0,1471	0,0012
			0,0789	0,0005			0,0588	0,0005
			0,0132	0,0001			0,1667	0,0014
			0,0658	0,0004			0,0196	0,0002
							0,3431	0,0022
							0,0098	0,0001
							0,0098	0,0001
SCM138	76	6	0,0066	0,0000	51	8	0,0098	0,0001
			0,3355	0,0015			0,5098	0,0025
			0,0263	0,0002			0,1078	0,0009
			0,5658	0,0016			0,2157	0,0017
			0,0066	0,0000			0,0196	0,0002
			0,0592	0,0004			0,0098	0,0001
							0,1078	0,0009
		0,0196	0,0002					

RAPDs ermittelten Werte. Aus theoretischen Überlegungen geht hervor, daß bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $P = 0,05$ mindestens 59 Pflanzen für den Nachweis von Allelen mit einer Häufigkeit von $p \geq 0,05$, und mindestens 77 Pflanzen für das Auffinden von Allelen mit einer Häufigkeit von $p \geq 0,04$ benötigt werden. Diese Überlegungen zeigen, daß bei dem gegebenen Umfang immerhin Allelfrequenzen in dieser Größenordnung aufzuspüren sind. Jedoch bedarf es für den Nachweis sehr seltener Allele eines wesentlich höheren Pflanzenumfangs.

3.3.4 Maßzahlen für den Polymorphiegrad molekularer Marker

Die in den vorangegangenen Kapiteln aufgelisteten Schätzwerte für die Allelfrequenzen stellen die Grundlage für die Berechnung der in Kapitel 2.3.2.2 vorgeschlagenen Maßzahlen \hat{H} (erwarteter Heterozygotiegrad), PIC (polymorphic information content) und \hat{k}_e (effektive Anzahl Allele) dar. In der Tabelle 3.21 sind die Werte für die Maßzahlen der einzelnen Marker aufgelistet. Definitionsgemäß liegt der Wert für \hat{H} und PIC bei dominanten Markertypen wie RAPDs unter 0,5 und die Anzahl effektiver Allele \hat{k}_e bei maximal 2. Aus diesem Grund sind solche biallelen Markertypen auf der Basis der Bewertung von Einzel-Loci nicht unmittelbar mit den Multiallelsystemen wie RFLPs und SSRs vergleichbar. Die RAPD-Marker wurden deshalb nicht in die Auswertung einbezogen. Da diese Marker aber häufig mehrere Loci nachzuweisen vermögen, sind weitere Maßzahlen entwickelt worden, welche die Zahl der Loci pro Primer oder Primerkombination berücksichtigen (siehe Diskussion, Kapitel 4.4).

Die in Tabelle 3.18 angegebenen Maßzahlen stehen entsprechend ihrer Herleitung (Kapitel 2.3.2.2) miteinander in positiver Beziehung. Als gemeinsame Grundlage dient der für die Bewertung der genetischen Variabilität einer Population üblich verwendete Heterozygotiegrad bzw. Homozygotiegrad, für den über mehrere Loci ein Durchschnittswert gebildet werden kann. Ein Vergleich der beiden Sorten zeigt aber, daß diese Bewertung vom Markertyp abhängt. Sowohl in der Sorte 'Halo' (\hat{H} (SSR) = 0,54; \hat{H} (RFLP) = 0,47) wie in der Sorte 'Danko' (\hat{H} (SSR) = 0,70; \hat{H} (RFLP) = 0,40) liegt der Mittelwert von \hat{H} für SSR-Marker höher als für RFLPs. Bei der Sorte 'Halo' läßt sich der Unterschied im Heterozygotiegrad zwischen SSRs und RFLPs statistisch nicht nachweisen (Kruskal-Wallis-Test; $\chi^2 = 0,00$; $P = 1,00$), jedoch liegt in der Sorte 'Danko' der Schätzwert \hat{H} mit SSRs signifikant höher als wenn er mit RFLPs bestimmt wird (Kruskal-Wallis-Test; $\chi^2 = 4,50$; $P = 0,03$). Werden RFLPs und SSRs zusammen betrachtet, ist kein signifikanter Unterschied im Heterozygotiegrad der beiden festzustellen (\hat{H} ('Halo') = 0,51; \hat{H} ('Danko') = 0,57). Eine abschließende Bewertung des Vergleichs zwischen RFLPs und SSRs im Hinblick auf den Polymorphiegrad ist aufgrund des geringen Stichprobenumfangs nicht möglich.

Tabelle 3.18: Maßzahlen für den Polymorphiegrad von RFLP-Markern (*Xiag*) und SSR-Markern (SCM) bei Roggen, ermittelt in den Populationssorten 'Halo' und 'Danko'. Bei den RFLPs sind in den Spalten für \hat{H} in Klammern die verwendeten Restriktionsenzyme in gekürzter Form angegeben (EI = *EcoRI*, EV = *EcoRV*, D = *DraI*, H = *HindIII*).

Marker	'Halo'				'Danko'			
	\hat{H}	$V(\hat{H})$	PIC	\hat{k}_e	\hat{H}	$V(\hat{H})$	PIC	\hat{k}_e
<i>Xiag33</i>	0,283(EI)	0,007	0,268	1,39	0,219(EI)	0,007	0,195	1,28
	0,078(H)	0,003	0,075	1,08	0,096(EV)	0,005	0,094	1,11
<i>Xiag95</i>	0,654(D)	0,002	0,585	2,89	0,500(EI)	0,001	0,375	2,00
	0,630(H)	0,002	0,557	2,70	0,576(H)	0,011	0,548	2,36
<i>Xiag318</i>	0,632(D)	0,001	0,558	2,71	0,495(EV)	0,001	0,373	1,98
	0,537(H)	0,004	0,463	2,16	-	-	-	-
SCM2	0,445	0,002	0,371	1,80	0,649	0,001	0,576	2,85
SCM9	0,390	0,005	0,358	1,64	0,685	0,002	0,636	3,17
SCM109	0,744	0,001	0,709	3,91	0,802	0,001	0,779	5,06
SCM138	0,563	0,002	0,487	3,29	0,669	0,003	0,630	3,02

4. Diskussion

4.1 Entwicklung von SSR-Markern bei Roggen

Ein Bedarf an hoch polymorphen Markern für die Kartierung von Genen, aber auch zur Differenzierung von Linien und Sorten bestand vor allem bei selbstbefruchtenden Kulturpflanzenarten wie Weizen, Reis und Gerste. Für die Erstellung dichter Kopplungskarten mit Hilfe von RFLP-Markern, die in einer Vielzahl verfügbar sind, waren Forscher auf weite Kreuzungen angewiesen, die nicht selten über Artgrenzen hinweg erfolgten. So konnte ein hoher Polymorphiegrad von RFLPs (76%) bei Gerste erst nach interspezifischer Kreuzung mit *Hordeum spontaneum* erreicht werden (GRANER *et al.* 1991). Für die Erstellung einer dichten Genkarte auf der Basis von molekularen Markern bei Reis wurde von CAUSSE *et al.* (1994) eine interspezifische Kreuzung aus *Oryza indica* und *Oryza japonica* herangezogen. Aber auch in hochgezüchtetem Material von fremdbefruchtenden Arten ist zu vermuten, daß der Polymorphiegrad von RFLPs nicht immer befriedigend ist.

Erste Untersuchungen an simple sequence repeats (SSRs) konnten zeigen, daß diese Klasse repetitiver Sequenzen in eukaryotischen Genomen weit verbreitet ist (HAMADA *et al.* 1982; TAUTZ und RENZ 1984) und beim Menschen hypervariable Regionen darstellt (WEBER und MAY 1989; LITT und LUTY 1989). Zwar sind SSRs nach heutigen Erkenntnissen bei Pflanzen insgesamt nicht so häufig vorzufinden wie bei Wirbeltieren (LAGERCRANTZ *et al.* 1993), jedoch können aus Pflanzengenomen genügend SSRs isoliert werden, um auf allen Chromosomen in ausreichendem Maße locus-spezifische Marker zu gewinnen. Während sich erste Arbeiten über SSRs, vornehmlich Tetranukleotid-Motive, bei Pflanzen mit der Eignung und dem Potential für das genetische Fingerprinting befaßten (WEISING *et al.* 1989), wird über locus-spezifische SSR-Marker unter Aus-nutzung der PCR vor allem bei selbstbefruchtenden Pflanzenarten, wie Sojabohne (AKKAYA *et al.* 1992) und Reis (WU und TANKSLEY 1993) berichtet. Auch bei Fremd-befruchtern können die Eigenschaften von SSRs von Nutzen sein. Zwar kann in fremdbefruchtenden Fruchtarten wie Mais für RFLP-Marker und auch Isoenzyme eine hohe Variabilität beobachtet werden (GOODMAN und STUBER 1983; EVOLA *et al.* 1986), aber SSR-Marker lassen selbst in hochgezüchtetem Material einen höheren Polymorphiegrad erwarten. Als weiterer Vorteil ist die einfache und schnelle Analyse dieses PCR-gestützten Markersystems zu nennen. Die Isolierung und teilweise auch Kartierung von SSRs aus fremdbefruchtenden Arten wurde bereits bei Mais (TARAMINO und TINGEY 1996) und Zuckerrübe (MÖRCHEN *et al.* 1996; GROBEN 1997) beschrieben.

Informationen aus DNA-Datenbanken

Locus-spezifische Marker können auf die einfachste Art und Weise aus DNA-Sequenz-Datenbanken gewonnen werden. Die eigenen, an Roggen durchgeführten Untersuchungen über das Vorkommen von 1bp-, 2bp- und 3bp-SSR-Motiven führten allerdings zu keinem positiven Ergebnis. Problematisch in diesem Zusammenhang ist die Tatsache, daß es keine allgemein akzeptierten Vorgaben dafür gibt, ab welcher Wiederholungszahl einfache Motive als SSRs brauchbar sind. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Gesamtsequenzlänge von 12 Basen vorgegeben, was einem 1 bp-Motiv mit 12 Wiederholungen, einem 2 bp-Motiv mit 6 Wiederholungen und einem 3 bp-Motiv mit 4 Wiederholungen entspricht. Diese Kriterien sind im Vergleich zu MORGANTE und OLIVIERI (1993) relativ schwach und sind etwas strenger gewählt als bei BECKER und HEUN (1995) für Gerste. Als ein einziger möglicher Kandidat der Art *Secale cereale* bei geringerer Stringenz erschien ein T₁₀-Strang im Chalconsynthetase-Gen (Eintrag [SCDNACHS]). Als Hauptgrund für den Mangel an SSR-Motiven ist die geringe Zahl der für die Gattung *Secale* gefundenen Datenbank-Einträge (45 Sequenzen mit einer Gesamtlänge von 57 kb) zu nennen. Wird die Suche auf die Art *Secale cereale* beschränkt, verbleiben noch 37 Sequenzen eines Umfangs von 53 kb. Im Gegensatz dazu fanden BECKER und HEUN (1995) bei Gerste in 228 Sequenzeinträgen mit einer Länge von 374 kb insgesamt 115 SSR-Sequenzen, von denen 15 untersucht wurden, welche die meisten Wiederholungseinheiten trugen. Die Autoren wiesen für 10 der 15 SSR-Marker mehr als 2 Allele nach, allerdings waren nur SSR-Marker mit dem Motiv (AT)_n in der Lage, 3 oder mehr Allele zu detektieren. Es handelt sich damit genau um solche, hochvariablen Motive, die über den Weg der Klonierung kaum zu fassen sind. Eine umfangreiche Datenbank-Recherche von WANG *et al.* (1994) offenbarte unter anderem, daß SSRs in Monokotyledonen im Durchschnitt nur etwa ein Drittel so häufig vorkommen wie in Dikotyledonen. Bei Weizen wurden 7 SSRs in 144 kb Gesamtsequenz vorgefunden, davon allein 5 Trinukleotid-SSRs. Zwei dieser SSRs, die sich im γ -Gliadin-Pseudogen bzw. im LMW-Gluteningen befinden, wurden von DEVOS *et al.* (1995) genauer untersucht. Dabei konnten die Autoren in verschiedenen Weizensorten mehrere Varianten nachweisen. LEE *et al.* (1995) nutzten die gleichen SSR-Loci, um kanadische Weizensorten zu differenzieren. Weitere Untersuchungen, in denen aus Datenbank-Informationen SSR-Marker abgeleitet worden sind, erfolgten unter anderem bei Sojabohne (AKKAYA *et al.* 1992), Raps (LAGERCRANTZ *et al.* 1993), Mais (SENIOR und HEUN 1993) und *Arabidopsis* (BELL und ECKER 1994). Die genannten Beispiele bei den Getreidearten zeigen, daß eine weitreichende Nutzung von SSRs nur über die Klonierung und Isolierung aus DNA-Bibliotheken erfolgen kann.

Isolierung und Charakterisierung von Dinukleotid-SSRs aus DNA-Bibliotheken

Die von LAGERCRANTZ *et al.* (1993) und WANG *et al.* (1994) erhaltenen Ergebnisse aus Datenbanken deuten darauf hin, daß Dinukleotid-Motive auch im Pflanzenreich am häufigsten vertreten sind. Eine weitere Aufschlüsselung ergab, daß das $(AT)_n$ -Motiv, gefolgt vom $(CT/GA)_n$ -Motiv, am weitesten verbreitet ist. Aus diesem Grund ist in der vorliegenden Arbeit in genomischen DNA-Bibliotheken ausschließlich nach Dinukleotid-SSRs gesucht worden. Jedoch verhindert die Selbstkomplementarität des $(AT)_n$ -Motivs weitgehend die Isolierung derartiger SSRs. Die Experimente sind daher auf das $(CT/GA)_n$ - und das $(GT/CA)_n$ -Motiv beschränkt worden. Vorgeschlagene Strategien für eine Anreicherung positiver Klone (OSTRANDER *et al.* 1992; KIJAS *et al.* 1994) könnten aber zu einer effektiveren Erfassung von $(AT)_n$ -SSRs beitragen, etwa in der Form, daß $(AT)_n$ enthaltende Inserts an die an eine Säule gebundene Sonde hybridisiert und nach Abtrennung kloniert werden.

Nach Southern-Hybridisierung von $(CT)_{10}$ und $(GT)_{10}$ mit *AluI* verdauter genomischer Roggen-DNA ist ein Signal sichtbar, das sich über einen Bereich von 100 bis 2000 bp erstreckt und einem „Schmier“ gleicht. Das deutet auf eine mehr oder weniger gleichmäßige Verteilung der beiden Motive $(CT/GA)_n$ und $(GT/CA)_n$ über das Roggengenom hin, wobei das stärkere Signal für das zuletzt genannte Motiv auf eine höhere Frequenz hinweist. BEYERMANN *et al.* (1992) kamen im Rahmen von Untersuchungen zum DNA-Fingerprinting mit der Sonde $(CT)_8$ zum gleichen Ergebnis, während sie wie bei Gerste mit dem Trinukleotid-Motiv $(GTG)_5$ und der Tetranukleotid-Sequenz $(GATA)_4$ ein distinktes Bandenmuster erzeugen konnten. MA *et al.* (1996) beobachteten beim Weizen nach Southern-Hybridisierung mit $(AC)_{15}$ und $(AG)_{15}$ wie beim Roggen ein „Schmier“-Signal. Daraus wird deutlich, daß sich Dinukleotid-Motive bei Gramineen im Gegensatz zu Tetranukleotid-Motiven nicht für das DNA-Fingerprinting eignen, aber daß sie für die Entwicklung locus-spezifischer Marker zu bevorzugen sind.

Der Anteil von $(CT/GA)_n$ - und $(GT/CA)_n$ -SSRs zusammen liegt übereinstimmend in allen drei untersuchten DNA-Bibliotheken in der Größenordnung von 0,11 bis 0,22 %. Die Abnahme der Anzahl positiver Klone aus den λ -Bibliotheken nach dem zweiten Screening könnte zwei Ursachen haben. Zum einen kann der Anteil falsch positiver Klone sehr hoch gelegen haben und/oder zum anderen konnte aufgrund der hohen Plattierungsdichte die Position einiger positiven Klone auf der Platte nicht genau bestimmt werden. Die wahre Frequenz positiver Klone liegt somit zwischen 1,1 und 2,2 %. Einen ähnlich hohen Verlust von vermutlich positiven Klonen während des zweiten Screening stellten BRYAN *et al.* (1997) bei Weizen fest. Höhere Frequenzen, ebenfalls bei Weizen fanden MA *et al.* (1996) in einer vergleichbaren DNA-Bibliothek (durchschnittliche Insertgröße 620 bp), in

der $(GT/CA)_n$ mit 2,13 ‰ und $(CT/GA)_n$ mit 2,92 ‰, insgesamt also mit etwa 5 ‰ vertreten waren.

In den drei DNA-Bibliotheken wurden insgesamt etwa 161.000 kb erfaßt, so daß im Roggen zwischen 270 und 520 kb ein $(CT/GA)_n$ - bzw. ein $(GT/CA)_n$ -SSR zu erwarten ist. Wird für den Winterroggen nach BENNETT und SMITH (1976) ein 4C-Gehalt von 38,0 pg pro Zelle, was einer haploiden Genomgröße von 9120 Mbp entspricht, zugrunde gelegt, dürften im Roggen-Genom ohne Berücksichtigung von $(AT)_n$ -SSRs zwischen 17.500 und 34.000 Dinukleotid-SSRs existieren. Das Mittel dieser Angaben liegt etwas höher als bei Gerste, für die LIU *et al.* (1996) eine Anzahl von etwa 23.000 $(CT/GA)_n$ - und $(GT/CA)_n$ -SSRs vermuten, und niedriger als beim Weizen, der über etwa 60.000 dieser Loci verfügt (RÖDER *et al.* 1995). Neuere Schätzungen von MA *et al.* (1996) gehen sogar von etwa 130.000 $(CT/GA)_n$ - und $(GT/CA)_n$ -SSRs im Weizen aus. Wird für diese beiden Getreidearten ebenfalls die Genomgröße berücksichtigt, welche für die Gerste etwa 4900 Mbp und für den hexaploiden Weizen etwa 16.000 Mbp beträgt (ARUMUGANATHAN und EARLE 1991), kann davon ausgegangen werden, daß mit der Genomgröße die absolute Zahl der SSRs ansteigt. Diesen Sachverhalt bestätigen auch die Untersuchungen von PANAUD *et al.* (1995), bei Reis, dessen Genom eine Größe von etwa 450 Mbp besitzt und der etwa 2600 $(CT/GA)_n$ und $(GT/CA)_n$ -SSRs beherbergt. Bei allen Untersuchungen dieser Art muß aber beachtet werden, daß Schätzungen von Frequenzen aus DNA-Bibliotheken mit unterschiedlicher mittlerer Insertgröße differieren können, da die Gefahr besteht, daß in Bibliotheken mit großen Inserts (2 bis 20 kb) in Clustern auftretende SSRs nicht erkannt werden, und damit die Zahl der SSRs unterschätzt wird. CONDIT und HUBBELL (1991) zeigten am Beispiel von Mais und *Piper reticulatum*, daß die Anzahl der genannten Dinukleotid-SSRs in den *Sau3A*-Bibliotheken 5 bis 8 mal höher geschätzt wurde als in *EcoRI*-Bibliotheken.

Eine weitergehende Unterteilung der Motive von Dinukleotid-SSRs beim Roggen in perfekte, imperfekte und zusammengesetzte SSRs ergab, daß etwa 57 % der in den sequenzierten positiven Klonen enthaltenen SSRs perfekte repeats darstellten und imperfekte wie zusammengesetzte repeats etwa zu gleichen Teilen (23 % bzw. 20%) auftraten. Die zusammengesetzten repeats bestanden zu mehr als 50 % aus dem Motiv $(GT)_m(AT)_n$. MA *et al.* (1996) fanden bei Weizen in zusammengesetzten repeats ebenfalls bevorzugt das $(GT)_n$ -Motiv vor, das jedoch zu 50 % mit $(CT)_m$ assoziiert war. Insgesamt enthielten die von MA *et al.* (1996) beschriebenen Dinukleotid-SSRs 8 % bzw. 26 % imperfekte repeats und 42 % bzw. 47 % zusammengesetzte repeats, während RÖDER *et al.* (1995) in ihren Untersuchungen ebenfalls an Weizen nur 26% zusammengesetzte repeats zählten. Die Diskrepanzen zeigen, daß ein allgemeines Schema für die genannten drei Klassen nicht erkennbar ist. Hingegen haben sowohl Nachforschungen in Datenbanken (LAGERCRANTZ *et al.* 1993; WANG *et al.* 1994) als auch nahezu alle bisherigen

experimentellen Untersuchungen an Pflanzen gezeigt, daß das (CT/GA)_n-Motiv gegenüber dem (GT/CA)_n-Motiv vorherrscht. Deshalb ist es erstaunlich, daß in der vorliegenden Arbeit ein umgekehrtes Verhältnis gefunden wurde. Weil die Sonden gemeinsam eingesetzt wurden, sind die Frequenzen der beiden Motive jedoch nicht wie in anderen Untersuchungen über Hybridisierungsexperimente erhalten worden, sondern aus den Sequenzen von 74 Klonen. Bei Betrachtung dieser Sequenzen müßte rückschließend insgesamt 26 mal die (CT)₁₀-Sonde und 56 mal die (GT)₁₀-Sonde hybridisiert haben. Somit hätten mehr als doppelt soviele (GT/CA)_n-SSRs als (CT/GA)_n-SSRs gezählt werden müssen. Bei Weizen beträgt dieses Verhältnis etwa 0,6 bis 0,7 (RÖDER *et al.* 1995; MA *et al.* 1996) und bei Gerste etwa 0,5 (LIU *et al.* 1996). Bei Reis kommen fast ebenso viele (GT/CA)_n-SSRs wie (CT/GA)_n-SSRs vor (PANAUD *et al.* 1995). Ein höherer Anteil von (GT/CA)_n-SSRs wurde bisher in der Zuckerrübe (MÖRCHEN *et al.* 1996) und in der Kiefernart *Pinus strobus* gefunden (ECHT und MAY-MARQUARDT 1996). CONDIT und HUB-BELL (1991) kommen bei Mais, abhängig von der DNA-Bibliothek, zu widersprüchlichen Ergebnissen. Da den genannten Untersuchungen ein mehr oder weniger großer Fehler anhaftet, sind auch Stichprobeneffekte nicht zu vermeiden. Es ist jedoch nicht davon auszugehen, daß sich die Genomzusammensetzung des Roggens wesentlich von anderen *Triticeae* unterscheidet. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, daß in den Hybridisierungsexperimenten im ersten Screening-Zyklus eine Vielzahl von (CT/GA)_n-SSRs nicht erfaßt worden ist oder die (CT)₁₀-Sonde beim Screening der Phagen-Bibliotheken bereits abgebaut war. Ein Einfluß des für die Klonierung verwendeten Restriktionsenzym kann zwar nicht ausgeschlossen werden, jedoch beruhen auch die von PLASCHKE *et al.* (1996) sowie MA *et al.* (1996) erarbeiteten Ergebnisse auf der Verwendung der Restriktionsenzyme *Mbo*I und *Sau*3A. Weitere Untersuchungen müssen klären, ob das (CT/GA)_n-Motiv im Roggen wie in den meisten anderen Pflanzenarten gegenüber dem (GT/CA)_n-Motiv häufiger vorkommt.

Von 74 Klonen konnten nur 57 für die Entwicklung von Primerpaaren verwendet werden. Als Ursachen sind zum einen Abbrüche der Sequenzierreaktionen an ungewöhnlich langen, d.h. mehr als 60 Wiederholungseinheiten umfassenden SSRs zu nennen, die sich in einer Abnahme des Signals und in einem „Stottern“ der Banden ausdrückten. Diese Instabilität hängt mit der starken Abnahme der Lesegenauigkeit der DNA-Polymerase zusammen. Zum anderen war bei 10 Klonen die Entwicklung eines Primers nicht möglich, da die SSR-Sequenz sich nahe der Vektorsequenz anschloß. Die PCR-Analyse der 57 Primerpaare führte zu einem relativ geringen Anteil spezifischer Produkte (47,4 %), deren Größen im erwarteten Bereich für die Sorte 'Carokurz' lagen, mit der die Bibliotheken erstellt wurden. In den anderen Fällen waren entweder mehrere Banden produziert worden, deren beobachtete Größen sich teilweise weit außerhalb des zu erwartenden Bereichs befanden, oder es wurde statt eines Produkts ein „Schmier“ erzeugt. Veränderte Mg²⁺-

Konzentrationen und/oder geringere Annealing-Temperaturen brachten keine Verbesserung. Die Wahl neuer Primer führte nur bei einem von 5 Klonen zum Erfolg, so daß vermutet werden kann, daß die meisten dieser SSR-Loci samt ihrer flankierenden Sequenz in repetitiven Bereichen liegen und damit einer spezifischen Amplifikation nicht zugänglich sind. Hingegen ist es LIU *et al.* (1996) bei Gerste gelungen, in solchen Fällen durch das Herstellen neuer Primer sowie veränderte PCR-Bedingungen eine höhere Spezifität zu erreichen. Die genannten Phänomene sind auch beim Weizen beobachtet worden (RÖDER *et al.* 1995). Hier lag die Zahl amplifizierter Produkte erwarteter Größe mit 36 % noch niedriger als bei Roggen. Bei BRYAN *et al.* (1997) waren es 32 %. MA *et al.* (1996) fanden bei 56 % ihrer SSR-Marker die erwartete Größe vor. Davon amplifizierten einige Primerpaare zusätzliche Loci, von denen einige dominant spalteten. Diese Beobachtung wurde auch in der vorliegenden Arbeit beim Marker SCM5 gemacht. BRYAN *et al.* (1997) gelangten in ihren Untersuchungen bei Weizen zu dem Schluß, daß von den ursprünglich als positiv erkannten Klonen aus dem ersten Screening nur 3 % als genetische Marker nutzbar sind. Als Möglichkeit zur Verbesserung der Ausbeute spezifischer SSR-Marker kommt die Klonierung von DNA-Sequenzen ohne oder mit geringer Repetitivität in Betracht. Dies kann mit Hilfe methylierungssensitiver Restriktionsenzyme geschehen, denn der besonders in den *Triticeae* hohe Anteil repetitiver Sequenzen, der beim Roggen etwa 90 % beträgt (FLAVELL *et al.* 1974), liegt in methylierter Form vor. Der in einem Experiment (Bibliothek C) durchgeführte Vorverdau genomischer Roggen-DNA mit dem methylierungs-sensitiven Restriktionsenzym *Pst*I trug jedoch nicht zur Erhöhung der Ausbeute bei. Hingegen konnten PLASCHKE *et al.* (1996) beim Weizen eine deutliche Verbesserung erreichen. So waren aus der von den Autoren beschriebenen *Pst*I/*Mbo*I-Bibliothek keine Primerpaare hervorgegangen, die einen „Schmier“ auf dem Gel erzeugten. Ein anderer Weg zur Reduktion repetitiver Klone in DNA-Bibliotheken beruht auf der Reassoziationskinetik, nach der repetitive Sequenzen in Lösung schneller miteinander hybridisieren als Sequenzen, die nur in wenigen Kopien vorliegen. Über Hydroxylapatit-Säulen kann aufgrund der unterschiedlichen Reassoziationsgeschwindigkeit repetitive DNA von single bzw. low copy-DNA abgetrennt werden. Dieses Verfahren ist zwar noch nicht zur Klonierung von SSRs eingesetzt worden, wurde aber in *Triticum tauschii* erfolgreich zur Suche nach RAPD-Markern genutzt, die mit einem Resistenzgen gegen den Getreide-nematoden *Heterodera avenae* gekoppelt sind (EASTWOOD *et al.* 1993).

Die Frage der Spezifität von SSR-Markern hat auch zu Überlegungen geführt, inwieweit SSR-Marker über Art- und Gattungsgrenzen hinweg übertragbar sind. Die Untersuchungen von RÖDER *et al.* (1995) zur Amplifikation von SSRs des Weizens in Gerste und Roggen haben gezeigt, daß es nur mit wenigen Markern gelungen ist, Amplifikationsprodukte zu erzeugen. Nur in einigen der PCR-Produkte war auch das entsprechende SSR-Motiv

nachzuweisen, so daß nur in diesen Fällen von homöologen Loci gesprochen werden kann. Einer Mitteilung von V. KORZUN (Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung, Gatersleben) zufolge liegt der Anteil der für die Amplifikation in Roggen verwendbaren SSR-Marker aus Weizen bei etwa 10 %. BRYAN *et al.* (1997) stellten fest, daß nur wenige SSR-Marker in der Lage waren, auch homöologe Loci der anderen beiden Komplemente des Weizengenoms aufzudecken. Im Gegensatz dazu waren die meisten von KRESOVICH *et al.* (1995) entwickelten SSR-Marker von Raps (*Brassica napus*) geeignet, auch in den Elterngenomen *B. oleracea* und *B. campestris* syn. *rapa* die entsprechenden SSR-Loci nachzuweisen. GROBEN (1997) konnte in seinen Untersuchungen an SSRs der Gattung *Beta* zeigen, daß eine Übertrag-barkeit innerhalb der Gattung möglich ist, aber zwischen Gattungen der *Chenopodiaceae* kaum gelingt. Die genannten Beispiele deuten auf die Notwendigkeit hin, zumindest auf Gattungsebene eigene SSR-Marker zu erzeugen.

Chromosomale Lokalisation und genetische Kartierung

Neben der genetischen Kartierung von SSR-Markern in spaltenden Populationen ist bei den Getreidearten auch die Möglichkeit der chromosomalen Lokalisation mit Hilfe von aneuploiden Linien gegeben. Während bei Roggen und Gerste verschiedene Testerstämme aus disomen und ditelosomen Additionslinien zur Verfügung stehen, kann beim Weizen eine eindeutige Zuordnung mit Hilfe von nullisomen-tetrasomen und ditelosomen Linien vorgenommen werden, da der Ausfall eines Chromosomensatzes oder eines Teils aufgrund der hexaploiden Konstitution keine Folgen hat. Aus dem Fehlen des Amplifikationsprodukts eines SSR-Markers in einer bestimmten nullisomen-tetrasomen bzw. ditelosomen Linie kann somit auf dessen chromosomale Lage bzw. Lage auf dem Chromosomenarm geschlossen werden. Hingegen ist bei Gerste und Roggen in der Additionslinie die PCR-Bande eines SSR-Markers zu erwarten, dessen addiertes Chromosom diesen SSR enthält. Daneben können aber auch unspezifische Kreuzreaktionen mit dem Weizenelster auftreten, so daß die Lokalisation eventuell erschwert wird. So waren von den 15 monomorphen spezifischen SSR-Markern des Roggens unter Verwendung von Agarosegelen nur 8 SSRs chromosomal zu lokalisieren. Bei den übrigen Markern war entweder die Amplifikation im Weizenelster sehr stark und eine roggen-spezifische Bande kaum zu erkennen, oder die roggen-spezifische Bande lag zu dicht am Amplifikationsprodukt des Weizens, um sie beobachten zu können. Ein weiteres Problem besteht darin, daß die für die Additionen verwendete Roggensorte 'Imperial' für einen SSR variabel ist. So kann das bei einer Pflanze der Sorte erhaltene Amplifikationsprodukt eine andere Größe besitzen als das aus dem addierten Chromosom bzw. Chromosomenarm. Falls zusätzlich unspezifische Banden in anderen Linien auftreten, kann die chromosomale Zuordnung fehlerhaft sein. Die chromosomale Lokalisation von SSRs mit Hilfe von aneuploiden Linien wurde bei Gerste

(LIU *et al.* 1996) sowie bei Weizen beschrieben (RÖDER *et al.* 1995; PLASCHKE *et al.* 1996; MA *et al.* 1996; BRYAN *et al.* 1997).

Der Polymorphiegrad der Roggen-SSR-Marker in der Kartierungspopulation lag mit 44 % etwas höher als der von RFLP-Markern des Roggens (38 %) (SENFT und WRICKE 1996). Mit Ausnahme von Chromosom 4R ist auf allen Chromosomen mindestens ein SSR-Marker genetisch kartiert worden. Falls die monomorphen SSR-Marker in anderen Kartierungspopulation kartiert werden könnten, läßt sich auch eine zuverlässigere Aussage über die Verteilung im Roggengenom machen. Bei Selbstbefruchtern wurden fast ausschließlich Linien für die Bewertung der Variabilität von SSR- und RFLP-Markern herangezogen. Dieser Aspekt wird in Kapitel 4.4 diskutiert. Nur in den Untersuchungen von LIU *et al.* (1996) bei Gerste ist ein Vergleich mit vier Kartierungspopulationen durchgeführt worden. Hier waren im Durchschnitt SSR-Marker etwa um 10 % polymorpher als RFLP-Marker. Unter den Fremdbefruchtern ist eine genetische Kartierung von SSR-Markern bisher nur bei Mais erfolgt (TARAMINO und TINGEY 1996). Auch hier zeigte sich eine Überlegenheit der SSR-Marker gegenüber RFLP-Markern bei Betrachtung von Inzuchtlinien. Die Unterschiede sind aber nicht so dramatisch wie in Selbstbefruchtern (siehe Kapitel 4.4). Die Erstellung dichter Genkarten unter Einschluß von SSR-Markern wird daher besonders bei bedeutenden selbstbefruchtenden Kulturpflanzen wie Weizen (V. KORZUN; pers. Mitteilung) und Reis vorangetrieben. Bei der zuletzt genannten Art ist CHEN *et al.* (1997) die Einordnung von 94 SSR-Markern in eine bereits bestehende RFLP-Karte gelungen. Mit weiteren 27 SSR-Markern konnte das Reisgenom auf allen 12 Chromosomen bei einem mittleren Abstand von 16 bis 20 cM zwischen zwei SSR-Markern abgedeckt werden. Eine Bildung von Clustern in der Nähe der Centromere oder Telomere war nicht erkennbar.

4.2 Kartierung von AFLP-Markern bei Roggen

Die von der Firma Keygene (Wageningen, Niederlande) entwickelte AFLP-Markertechnik (ZABEAU und VOS 1993) hat in den vergangenen zwei Jahren zu einer Beschleunigung in der Durchführung von Markerstudien geführt. Diese Methode wurde besonders zur hohen Anreicherung mit Markern in Regionen eingesetzt, in denen sich agronomisch wichtige Gene befinden. So konnten BALLVORA *et al.* (1995) bei der Kartoffel den Bereich um das Gen *Gro1*, das Resistenz gegen den Zystennematoden *Globodera rostochiensis* vermittelt, mit zwei AFLP-Markern auf 1,4 cM eingrenzen. In 1105 untersuchten Pflanzen einer spaltenden Population konnten außerdem für zwei weitere AFLP-Marker keine Austauschtypen gefunden werden. Auch der Abschnitt, auf dem das Resistenzgen *R1* gegen *Phytophthora infestans* liegt, wurde ebenfalls mit AFLPs feinkartiert (MEKSEM *et al.* 1995). Zwei AFLP-Marker kosegregierten in 461 Pflanzen mit dem *R1*-

Gen. Als weitere Beispiele sind Untersuchungen zur Identifizierung von QTLs (Quantitative Trait Loci) für Überflutungstoleranz bei Reis (NANDI *et al.* 1997) und zur Gruppierung salztoleranter Ökotypen von *Hordeum spontaneum* (PAKNIYAT *et al.* 1997) zu nennen. Ein Vorteil der AFLP-Methode liegt in der Darstellung von etwa 50 bis 100 Banden auf einem Gel, die von einer Primerkombination mit jeweils drei selektiven Banden am 3'-Ende erzeugt werden (VOS *et al.* 1995). Somit kann in einer spaltenden Population bereits mit wenigen Primerkombinationen eine große Zahl an Markern erhalten werden. Die AFLP-Untersuchungen der vorliegenden Arbeit bei Roggen zeigen, daß in der Kartierungspopulation mit 18 *EcoRI/MseI*-Primerkombinationen zwischen 40 und 90 Amplifikationsprodukte im Bereich zwischen 80 bp und 450 bp erfaßt werden konnten. Das entspricht einem Durchschnitt von etwa 65 Banden pro Kombination. Eine höhere Variation beobachteten QI und LINDHOUT (1997) mit 24 *EcoRI/MseI*-Primerkombinationen bei Gerste. In 16 Linien fanden die Autoren abhängig von der Primerkombination 50 bis 180 Banden zwischen 80 bp und 510 bp vor. Im Mittel sind etwa 90 Banden nachgewiesen worden. Einen Zusammenhang zwischen der Bandenzahl und dem AT-Gehalt der *MseI*-Primer bestand im Gegensatz zu Gerste bei Roggen nicht. Der Unterschied in der mittleren Bandenzahl zwischen Gerste und Roggen kann sowohl durch das größere Ausschnittfenster (510 bp statt 450 bp) als auch durch das breitere Pflanzenmaterial erklärt werden. Es ist wahrscheinlich, daß in Populationen des Roggens mehr Banden erzeugt werden als in einer F₂-Nachkommenschaft. Außerdem verwendeten QI und LINDHOUT (1997) zu einem Großteil andere Primerkombinationen. Eine gute Übereinstimmung besteht hingegen mit den Angaben von BECKER *et al.* (1995), der mit 16 Primerkombinationen ebenfalls durchschnittlich 65 Banden in den beiden Kreuzungseltern einer Gersten-Kartierungspopulation ermittelte.

Die Variation im Polymorphiegrad der untersuchten 18 Primerkombinationen in der Kartierungspopulation ist nicht durch Effekte zwischen den *EcoRI*- oder *MseI*-Primern zu erklären. Diese Feststellung trifft auch dann zu, wenn die GC-Gehalte der selektiven Basen berücksichtigt werden. Im Gegensatz dazu berichten KEIM *et al.* (1997) im Rahmen der Erstellung einer dicht besetzten Genkarte bei Sojabohne von einer Abnahme des Polymorphiegrades mit ansteigendem GC-Gehalt in den selektiven Basen der *EcoRI*- und *MseI*-Primer. Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, daß der durchschnittliche Polymorphiegrad von AFLPs in der Kartierungspopulation mit 12,5 % zwar höher lag als der von RAPDs aber deutlich niedriger als der von RFLPs und SSRs. Dieser Nachteil wird aber durch die höhere Anzahl analysierbarer Banden ausgeglichen. BECKER *et al.* (1995) erhielten in der von ihnen bearbeiteten doppelhaploiden Kartierungspopulation einen durchschnittlichen Polymorphiegrad von 11,3 % gegenüber 27,8 % mit genomischen RFLP-Sonden. QI und LINDHOUT (1997) verglichen die Polymorphiegrade in paarweisen Kombinationen aus 6 Gerstenlinien. Der Polymorphiegrad reichte abhängig von

der Elternkombination von 12,2 % bis 29 %. Ein Elternscreening kann somit genutzt werden, um eine geeignete Elternkombination für die Erstellung einer Kopplungskarte zu wählen. Bei der Sojabohne betrug der Polymorphiegrad der AFLP-Marker in einer Kartierungspopulation aus einer intraspezifischer Kreuzung je nach GC-Gehalt der selektiven Basen zwischen 10,1 % und 13,2 %. Für Fremdbefruchter liegen zur Zeit kaum Daten über den Polymorphiegrad von AFLP-Markern vor. SCHONDELMAIER *et al.* (1996) erhielten in einer F₂-Kartierungspopulation der Zuckerrübe mit vier Primerkombinationen 50 % polymorphe AFLP-Banden. MEKSEM *et al.* (1995) ermittelten bei der hochgradig heterozygoten Kartoffel einen durchschnittlichen Polymorphiegrad von 44 % auf der Basis von vier Primerkombinationen. Dieser Wert wurde aber aus einer Bulk-Segregant-Analyse mit resistenten und anfälligen Pflanzen gegen bzw. für *Phytophthora infestans* gewonnen. Ein Vergleich von Fremd- mit Selbstbefruchtern hinsichtlich des Polymorphiegrades ist nicht sehr aussagekräftig, da für die Genomkartierung von selbstbefruchtenden Arten in der Regel weite Kreuzungen vorgenommen werden. Beim Vergleich intraspezifischer Kreuzungen ist bei Fremdbefruchtern eigentlich immer ein höherer Polymorphiegrad als bei Selbstbefruchtern zu beobachten.

Die Tatsache, daß mit der AFLP-Technik einen hoher Durchsatz an analysierbaren Banden in relativ kurzer Zeit zu erzielen ist, hat bei einer Reihe von Kulturpflanzen dazu geführt, neue bzw. bereits bestehende Kopplungskarten erheblich anzureichern und zu erweitern. Die in dieser Arbeit kartierten 74 AFLP-Marker resultierten aus 8 Primerkombinationen. Die Zahl der Marker kann durch die übrigen *EcoRI/MseI*-Primerpaare sowie neue Restriktionsenzym-Kombinationen (*PstI/MseI*, *HindIII/MseI*, etc.) erheblich gesteigert werden. Eine von KEIM *et al.* (1997) vorgestellte Genkarte der Sojabohne umfaßt 840 Marker, wovon 650 AFLP-Marker darstellen. Die erstaunlich große Gesamtlänge von 3441 cM kommt durch die Verwendung von rekombinanten Inzuchtlinien als Kartierungspopulation zustande. Eine Einordnung von AFLP-Markern in vorhandene RFLP-Karten wurde unter anderem bei der Gerste (BECKER *et al.* 1995; WAUGH *et al.* 1997), Kartoffel (VAN ECK *et al.* 1995), Reis (MACKILL *et al.* 1996) und bei der Zuckerrübe (SCHONDELMAIER *et al.* 1996) vorgenommen. Auf die mit AFLP-Markern einhergehenden Veränderungen in einigen Genkarten wird im folgenden Kapitel eingegangen.

Ein Nachteil von AFLP-Markern liegt in ihrer geringeren Information in F₂-Populationen gegenüber Markern mit kodominanter Ausprägung aufgrund der überwiegend dominanten Vererbung. Außerdem ist als methodischer Nachteil der AFLP-Analyse die für eine vollständige Restriktion erforderliche hohe DNA-Qualität zu nennen, wie sie auch für die RFLP-Analyse benötigt wird. Hingegen ist für die Analyse von SSRs DNA mit einem niedrigeren Reinheitsgrad ausreichend. DONINI *et al.* (1997) konnten zudem zeigen, daß Template-DNA, die aus verschiedenen Geweben isoliert worden war, zu unterschiedlichen Amplifikationsmustern führen kann, wenn methylierungssensitive Restriktionsenzyme ein-

gesetzt werden. Die Autoren wiesen einen unterschiedlichen Methylierungsgrad in verschiedenen Pflanzenorganen nach. Für phylogenetische Studien und die Übertragbarkeit von AFLP-Markern von einer auf andere Populationen ist deshalb die Verwendung von physiologisch gleichen Geweben erforderlich. Untersuchungen bei Gerste an drei unterschiedlichen doppelhaploiden Populationen führten zu 81 AFLP-Markern, die in mehr als einer Kartierungspopulation spalteten (WAUGH *et al.* 1997). Diese Marker kartierten zu ungefähr den gleichen Positionen in den drei Populationen. Geringfügige Änderungen in der Anordnung waren nur auf Chromosom 7H vorzufinden, sowie in Regionen mit dichter Markerbesetzung, in denen aber die Markerreihenfolge nicht eindeutig geklärt ist. Die Autoren konnten auch eine Übereinstimmung in der relativen chromosomalen Lage für 9 von 25 AFLP-Markern der von BECKER *et al.* (1995) verwendeten doppelhaploiden Kartierungspopulation feststellen. Ein eindeutiger Beweis der Homologie von Amplifikationsprodukten kann nur durch Sequenzierung der zu vergleichenden Produkte erbracht werden. ROUPPE VAN DER VOORT *et al.* (1997) fanden in ihren Experimenten zum Vergleich mehrerer Kopplungskarten der Kartoffel, daß 19 von 20 sequenzierten Amplifikationsprodukten, die in den verschiedenen Populationen die gleiche Größe hatten, zueinander homolog waren. Die Beispiele zeigen, daß die Homologie von komigrierenden AFLP-Markern in einer Spezies meistens gewährleistet ist und zur Erstellung einer AFLP-Referenzkarte genutzt werden kann. Eine solche Karte stellt für jede gewünschte Region einen eng gekoppelten Marker zur Verfügung. Voraussetzung für diese Übertragbarkeit ist eine klare Nomenklatur der Marker, die eine exakte Größenbestimmung einschließt. Die Reproduzierbarkeit von AFLP-Mustern in verschiedenen europäischen Laboratorien konnte von JONES *et al.* (1997) gezeigt werden. Die in der vorliegenden Dissertation erarbeiteten AFLP-Marker bei Roggen und ihre eindeutige Bezeichnung können damit für weitere Kartierungsstudien eine wertvolle Hilfe darstellen.

4.3 Erstellung einer dicht besetzten Genkarte des Roggens

Charakterisierung der Genkarte der Kartierungspopulation

Die in dieser Arbeit vorgestellte Genkarte der Kartierungspopulation ist gegenüber dem Stand von SENFT (1996) auf nahezu die doppelte Länge erweitert worden, wobei die Dichte der Karte nur geringfügig erhöht werden konnte. In einem wesentlichen Maße trugen dazu SSR- und vor allem AFLP-Marker bei.

Über die durch Rekombination meßbare Gesamtlänge der sieben Roggenchromosomen gibt es zwar keine genauen Anhaltspunkte, doch ist von etwa 13 bis 14 Chiasmata pro Zelle auszugehen, was durchschnittlich zwei Chiasmen pro Chromosom entspricht (REES 1955). Die Chiasmen werden in der Regel an der Grenze zwischen Euchromatin und den

telomeren Heterochromatinblöcken ausgebildet (JONES 1978). Die Anzahl ist aber nicht nur von der physikalischen Länge der einzelnen Chromosomen abhängig. Bereits REES (1955) stellte fest, daß zwischen Inzuchtlinien des Roggens in der Chiasmafrequenz große Schwankungen auftreten, die in Populationen nicht beobachtet werden. Da alle Kartierungspopulationen auf Inzucht beruhen, ist die Folge, daß selbst bei vollständiger Genomabdeckung mehr oder weniger große Unterschiede in der Kartenlänge verschiedener Populationen zustandekommen können. Die Ausbildung eines Chiasmas ist außerdem nicht immer mit einem Rekombinationsereignis verbunden (JONES 1987). Unter der oben genannten Annahme führt eine einfache Überlegung zu einem groben Näherungswert für die gesamte Kartenlänge von mindestens 1400 cM. Die Herstellung einer Beziehung zwischen der cytologischen Länge eines Chromosoms und der durch Rekombination gemessenen, genetischen Länge ist im Roggen aufgrund der Variation zwischen Linien im Giemsa-Bandenmuster (C-Banding) möglich. So ist ein Polymorphismus im Heterochromatingehalt in Populationssorten weit verbreitet (WEIMARK 1975; GIRALDEZ *et al.* 1979). Unterschiede zwischen Inzuchtlinien sind dazu genutzt worden, Polymorphismen insbesondere an Telomeren genetisch zu kartieren. LUKASZEWSKI (1992) setzte die physikalischen Abstände zwischen sechs C-Banden auf Chromosom 1R in Beziehung mit ihren Rekombinationsfrequenzen und ermittelte eine genetische Länge von 96 bis 110 cM. Für die Erstellung einer Genkarte von Chromosom 1R mit RFLP-Markern schlossen WANOUS und GUSTAFSON (1995) ebenfalls telomere C-Banden ein und kamen auf eine Gesamtlänge von 247 cM. Der sich aus den beiden Untersuchungen ergebende Unterschied in der genetischen Länge des Chromosoms von mehr als 100 cM ist durch die 27 RFLP-Loci erklärbar, die zusätzliche Rekombination aufgedeckt haben. Ein Vergleich der cytologischen Karte mit der genetischen Karte von 1R führte in beiden Arbeiten zu einem ähnlichen Ergebnis. Während in der Centromerregion die Rekombinationsfrequenzen im Verhältnis zur physikalischen Länge klein sind, ist das Verhältnis in Richtung der Subtelomere umgekehrt. Auch für andere Chromosomen konnte gezeigt werden, daß Rekombination in der perizentrischen Region unterdrückt und in distalen Chromosomenbereichen erhöht ist. Die im Rahmen dieser Dissertation erzielten Ergebnisse stimmen damit überein. Chromosom 1R konnte auf dem langen Arm nur ungenügend abgedeckt werden. Das mit den meisten Markern (44) besetzte Chromosom 2R weist bereits eine Länge von über 280 cM auf, was darauf schließen läßt, daß dieses Chromosom nahezu vollständig erfaßt wurde. Ähnlich dürfte es sich mit Chromosom 6R verhalten, das mehr als 80 % der von WANOUS *et al.* (1995) für 6R angegebenen Länge besitzt. Die auf Chromosom 4R liegende, aber ungekoppelte Gruppe sowie die vier weiteren, keinem der sieben Chromosomen zuzuordnenden Kopplungsgruppen, deuten möglicherweise darauf hin, daß weitere Regionen mit extrem hoher Rekombination („hot spots“) existieren. Andererseits können auch Boniturfehler dazu führen, daß eine vorhandene genetische Kopplung nicht erkannt

wird. Werden die von WANOUS und GUSTAFSON (1995) sowie WANOUS *et al.* (1995) ermittelten Kartenlängen der Chromosomen 1R, 6R und 7R auf alle sieben Chromosomen extrapoliert, würde sich eine Gesamtlänge von etwa 1700 cM ergeben. Der Umfang der vorliegenden Kopplungskarte beträgt 1344 cM, was unter dieser Annahme einer Genomabdeckung von ungefähr 80 % entspräche.

Den bedeutendsten Beitrag zur Erweiterung der Genkarte lieferten AFLP-Marker. Die Verteilung der AFLP-Marker auf die sieben Chromosomen ist allerdings nicht gleichmäßig. Diese hängt in erster Linie von der individuellen Chromosomenlänge bzw. dessen DNA-Gehalt ab. Es ist auch eine Beziehung zwischen der Anzahl AFLP-Marker und der anderer Marker je Chromosom festzustellen ($r = 0,72$). Daraus kann gefolgert werden, daß eine Kopplungsbeziehung eher erkannt wird, wenn bereits viele Marker auf einem Chromosom vorliegen. Ähnlich wie von SCHONDELMAIER *et al.* (1996) bei der Zuckerrübe beschrieben, tritt auch bei Roggen in einigen Regionen eine Clusterbildung auf, darunter jeweils ein Abschnitt auf den Chromosomen 5R und 7R sowie zwei Bereiche auf Chromosom 2R. Allein diese Marker stellen etwa 42 % der kartierten AFLPs. Auf der von KEIM *et al.* (1997) erstellten Genkarte der Sojabohne sind die AFLP-Marker ebenfalls sehr uneinheitlich verteilt. Die Autoren vermuten in mehreren Regionen mit unterdrückter Rekombination die Lage der Centromere sowie andere hypermethylierte Bereiche.

Die allein durch AFLP-Marker ausgelöste Vergrößerung der Karte bemißt sich auf nahezu 300 cM (Tabelle 4.1). Es stellt sich die Frage, in welchem Maße die Integration von AFLP-Markern zu einem Zuwachs an den Enden der Kopplungsgruppen und zu einer Ausdehnung der Karte zwischen den Enden beigetragen hat. Diese Auswirkungen sind in Tabelle 4.1 dargestellt. In seiner Summe über alle Chromosomen ist der durch AFLP-Marker bedingte Anstieg der Kartenlänge zu etwas weniger als der Hälfte (126 cM) durch das Anfügen an die Enden der Kopplungsgruppen entstanden. Eine Ausdehnung um 169 cM fand innerhalb der beiden äußersten Marker statt. Die bestehende Lücke zwischen den beiden Kopplungsgruppen auf Chromosom 4R konnte bisher nicht mit AFLP-Markern geschlossen werden. Dies kann eventuell durch Kartierung weiterer AFLP-Marker erreicht werden. Bei der Gerste ist es BECKER *et al.* (1995) gelungen, drei Lücken in einer RFLP-Karte auf den Chromosomen 2, 4 und 6 mit Hilfe von AFLP-Markern zu schließen. Diese Verknüpfung war aber auch mit einem Längenzuwachs von fast 300 cM verbunden. Die Integration von 116 AFLP-Markern führte dort insgesamt zu einem Anstieg von 1096 cM auf 1873 cM. Davon waren 375 cM für eine Ausdehnung innerhalb der von anderen Markern besetzten Regionen verantwortlich, an die Enden sind durch AFLP-Marker 104 cM angefügt worden. Diese Resultate zeigen im Vergleich zu den hier gefundenen Ergebnissen bei Roggen eine größere Auswirkung der integrierten AFLP-Marker auf die Streckung in bereits besetzten Regionen. Die Autoren konnten weitgehend Datenfehler ausschließen, die bei der Berechnung zu überhöhten Rekombinationswerten führen. Sie

konnten am Beispiel des Chromosomenarms 2L außerdem zeigen, daß der Streckungseffekt in verschiedenen Kartierungspopulationen unterschiedlich stark ist. Bei der Betrachtung einzelner Chromosomen fallen die Auswirkungen der AFLP-Marker unterschiedlich aus. Während eine Angliederung an die Enden nur bei den Chromosomen 2, 3, 6, und 7 stattfand, war mit Ausnahme von Chromosom 6 eine mehr oder weniger starke Streckung zu beobachten. Die selbst erarbeiteten Ergebnisse bei Roggen zeigen ebenfalls kein einheitliches Verhalten für die einzelnen Chromosomen. So hat der durch AFLPs bedingte Anstieg in den beiden längsten Chromosomen 2R und 6R unterschiedliche Ursachen. Während bei Chromosom 2R 50 cM des gesamten Zuwachses von 67 cM durch Streckung des bereits mit anderen Markern abgedeckten Bereichs zustandekommen, ist der Anstieg in Chromosom 6R im Wesentlichen durch Anfügen von AFLP-Markern an den Enden zu erklären.

Tabelle 4.1: Auswirkungen der Integration von AFLP-Markern auf die Erweiterung der Genkarte. Angegeben ist neben der Markerzahl und der Gesamtlänge (in cM) der durch AFLPs bedingte Anstieg in der Kartenlänge durch Anfügung an die Enden der Kopplungsgruppen bzw. durch Streckung zwischen den Enden.

Karten-Kriterium	Chromosom							Gesamt
	1R	2R	3R	4R	5R	6R	7R	
Anzahl Marker gesamt	14	44	20	18	24	36	27	196
Anzahl AFLP-Marker	4	18	5	6	12	12	13	70
Gesamtlänge ohne AFLPs (cM)	79	216	105	103	96	196	132	927
Gesamtlänge (cM)	94	283	122	144	123	270	187	1223
Zuwachs an den Enden (cM)	6	17	0	24	13	48	17	125
Streckung zwischen Enden (cM)	9	50	17	17	14	26	38	171

Abweichende Spaltungen auf Chromosom 1R

Neben anderen Chromosomen, in denen einzelne Marker eine gestörte Spaltung zeigen (5R, 6R, 7R) ist besonders die perizentrische Region auf Chromosom 1R hervorzuheben. Mögliche Ursachen für das vollständige Fehlen einer Homozygotenklasse bei einigen aufeinanderfolgenden Markern wurden von SENFT und WRICKE (1996) diskutiert. Die im Rahmen dieser Dissertation zusätzlich kartierten Marker in diesem Abschnitt, nämlich der

RFLP-Marker *XTri25-11* und der SSR-Marker SCM39, weisen ebenfalls abweichende Spaltungsverhältnisse auf. Während eine Homozygotenklasse bei SCM39 nicht auftaucht, ist sie bei *XTri25-11* schwach besetzt. Die χ^2 -Analysen zeigen, daß Selektion gegen einen homozygoten Genotyp wirksam ist und daher Zygotenselektion vorliegt. Diese Feststellung trifft für alle dort spaltenden kodominanten Marker zu. Auch eine 1:2:0-Spaltung, die der Zygotenselektion und dem Ausfall bzw. der schwachen Besetzung der Homozygotenklasse zugrundeliegt, kann für keinen dieser Marker abgelehnt werden. Als Hypothesen wurden eine Inversionsheterozygotie in der F_1 sowie das Vorliegen zweier Letalfaktoren vorgeschlagen (SENF 1996). Die Inversionshypothese ist aus mehreren Gründen nicht mehr haltbar. Zwar ist die Hypothese mit der 2:1:0-Spaltung vereinbar, wenn durch die Inversion mindestens ein Bruch zur Letalität in der Zygote führt. Neben diesem „Letalfaktor“ dürften Rekombinanten im invertierten Segment aber nur dann auftreten, wenn darin Doppel-Crossover stattfinden. Dies dürfte in einem invertierten Stück, welches das Centromer einschließt, sehr unwahrscheinlich sein, wenn sich die Inversion nicht auf ein sehr langes Segment erstreckt. Außerdem wird die Lage von *XTri25-11* auf dem kurzen Arm von 1R bestätigt (LANGRIDGE *et al.* 1993). Im Rahmen einer Diplomarbeit (K. KULLIG) ist die Inversionshypothese auch cytologisch entkräftet worden. So wurde einerseits durch Längenmessung in der Mitose kein signifikanter Längenunterschied zwischen den homologen Chromosomen von Individuen mit heterozygotem *Per7*-Genotyp festgestellt, was für eine Inversion aber nicht zwingend sein muß. Die Giemsa-Färbung offenbarte ebenfalls keinen Hinweis auf eine Inversion, jedoch kam in einem der Chromosomen eine zusätzliche Heterochromatin-Bande unterhalb der stark ausgeprägten C-Bande

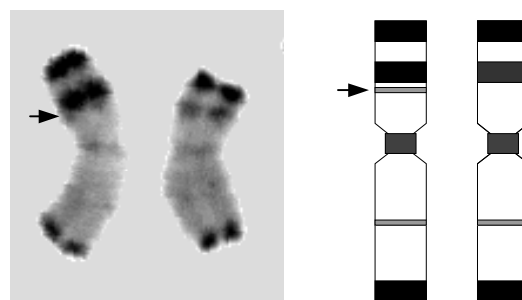


Abbildung 4.1: Karyogramm von Chromosom 1R eines für eine polymorphe C-Bande heterozygoten Genotyps der Kartierungspopulation. Der Pfeil weist auf die polymorphe C-Bande hin. (Bild: A. SCHUBERT, K. KULLIG)

am NOR zum Vorschein (Abbildung 4.1). Ob diese Mutation die Ursache der gestörten Spaltung oder einen cytologischen Marker ohne negative Auswirkungen darstellt, konnte bisher nicht geklärt werden. GIRALDEZ *et al.* (1979) wiesen auf eine hohe Variation im C-Bandingmuster von Inzuchtlinien des Roggens hin. Da die Kartierungspopulation einer Synthese aus mehreren Populationsorten entspringt, kann es sich auch um eine im Sortenmaterial vorliegende Chromosomenmutation handeln. Die aus der amerikanischen Sorte 'Dakold' eingekreuzte Selbstfertilität und die damit einhergehende Inzuchtdepression kann ebenfalls zu der Störung auf Chromosom 1R, möglicherweise direkt am S-Locus geführt haben, so daß die Hypothese mit einem oder zwei Letalgenen weiter aufrechtzuerhalten ist. Auch der Selbstinkompatibilitätsmechanismus kann als Ursache für die stark abweichenden Spaltungen in Frage kommen. Auf die Schätzung der Rekombinationswerte zwischen kodominanten Markern haben abweichende Spaltungen keinen Einfluß (WAGNER *et al.* 1992).

Vergleich mit anderen Genkarten des Roggens

Eine erste Genkarte des gesamten Roggengenoms auf der Basis von RFLP-Markern und einigen biochemischen Markern wurde von DEVOS *et al.* (1993b) vorgelegt. Als Sonden kamen ausschließlich genomische und cDNA-Sonden des Weizens zum Einsatz. Die Eignung heterologer DNA-Sequenzen als RFLP-Sonden ermöglichte die Aufdeckung weiterer chromosomaler Rearrangements des Roggengenoms im Vergleich zum Weizen. Kopplungskarten des Roggens oder einzelner Roggenchromosomen, die von anderen Arbeitsgruppen entwickelt wurden, schlossen auch homologe, also aus dem Roggengenom stammende, meist genomische Klone als RFLP-Sonden ein (PHILIPP *et al.* 1994; WANOUS und GUSTAFSON 1995; WANOUS *et al.* 1995; LOARCE *et al.* 1996; SENFT und WRICKE 1996; KORZUN *et al.* 1997).

Nahezu alle genannten Genkarten und die im Rahmen dieser Arbeit entstandenen Karte weisen charakteristische Übereinstimmungen auf:

a) Alle Karten verfügen über mehr oder weniger große Lücken. Das heißt, eine vollständige Abdeckung des Roggengenoms ist noch nicht gelungen. Die vorliegende Karte, die eine Erweiterung der Karte von SENFT und WRICKE (1996) darstellt, mißt eine Länge von etwa 1350 cM, zeigt aber noch nicht oder schwach besetzte Bereiche auf den Chromosomen 1R, 2R, 4R und 7R. WANOUS und GUSTAFSON (1995) und WANOUS *et al.* (1995) erstellten detaillierte Karten von 1R und 7R. Die von LOARCE *et al.* (1996) entwickelte Genkarte, die knapp 340 cM umfaßt, enthält verhältnismäßig dicht besetzte Karten für die Chromosomen 4R, 5R und 7R. Mit Ausnahme der Chromosomen 3R, 4R und 6R ist auch die von KORZUN *et al.* (1997) veröffentlichte Genkarte gut

abgedeckt. Zusammen mit den Informationen von DEVOS *et al.* (1993b) liegt somit für jedes Chromosom eine hinreichende Auswahl an Markern vor.

b) Die Verteilung der Marker ist auf allen Chromosomen ungleichmäßig. Während um das Centromer eine dichte Ansammlung von Markern vorherrscht, sind in den distalen Bereichen größere Markerabstände die Regel. Eine rege Rekombination ist demnach auf die äußeren chromosomalen Regionen beschränkt. Auch die Auswahl der Marker hat einen Einfluß auf die Verteilung der Marker. Auf einigen Chromosomen ist eine bessere Verteilung von homologen RFLP-Markern beobachtet worden (LOARCE *et al.* 1996, SENFT und WRICKE 1996). DEVOS *et al.* (1993b) wählten für die Chromosomen 4R und 6R homologe Marker anhand ihrer Position bei Weizen aus und gelangten damit zu einer gleichmäßigeren Abdeckung.

c) In allen Arbeiten wird vom Auftreten gestörter Spaltungen berichtet. PHILIPP *et al.* (1994) fanden bei 34,3 % der Marker ein abweichendes Spaltungsverhältnis, besonders auf den Chromosomen 1R und 6R. Eine ähnliche hohe Zahl nennen WANOUS und GUSTAFSON (1995) sowie WANOUS *et al.* (1995) für die Chromosomen 1R, 6R und 7R. LOARCE *et al.* (1996) fanden zwei Cluster mit abweichenden Spaltungen auf den Chromosomen 4R und 5R vor. KORZUN *et al.* (1997) wiesen eine Häufung gestörter Spaltungen auf den Chromosomen 1R, 4R, 5R und 7R nach. Das häufige Auftreten von abweichenden Spaltungen auf Chromosom 1R, wie es auch bei SENFT und WRICKE (1996) und in dieser Arbeit gefunden wurde, deutet auf eine Beteiligung des Selbstinkompatibilitätslocus *S* hin. Überraschenderweise wurde über einen Einfluß auf Spaltungsverhältnisse von Seiten des auf Chromosom 2R liegenden zweiten Selbstinkompatibilitätslocus *Z* mit Ausnahme von GERTZ und WRICKE (1989) bisher nicht berichtet. Allgemein dürften die Auswirkungen der Inzucht, die einem jeden Kartierungsexperiment vorausgeht, die Hauptursache abweichender Spaltungsverhältnisse sein.

d) Hinsichtlich der Aufdeckung von Polymorphismen haben sich roggen-spezifische genomische Klone gegenüber heterologen Sonden als vorteilhaft erwiesen. Die im Rahmen dieser Arbeit geprüften cDNA-Klone des Roggens schnitten allerdings in ihrem Polymorphiegrad (17 %) schlechter ab als heterologe Sonden des Weizens (34 %; SENFT und WRICKE 1996). Es muß jedoch darauf hingewiesen werden, daß es sich dabei nicht um vorselektierte Klone handelte. Einen überaus hohen Polymorphiegrad genomischer Roggenklone stellten LOARCE *et al.* (1996) (65,6 %) und KORZUN *et al.* (1997) (75%) fest. Die dazu im Gegensatz stehende niedrige Quote polymorpher Marker bei SENFT und WRICKE (1996) ist auf die hochgezüchtete Ausgangspopulation zurückgeführt worden, aus der die beiden Kreuzungseltern stammen. Im Vergleich zu genomischen Roggenklonen lag der Anteil polymorpher Klone von heterologen Sonden bei LOARCE *et al.* (1996) zwischen 31,6 % für Hafer-cDNA-Klone und 41,2 % für genomische Klone des

Weizens. KORZUN *et al.* (1997) ermittelten für die letzte Klasse immerhin 66 %. Hohe Polymorphiegrade der Weizenklone zwischen 60 % und 65 % beobachteten WANOUS *et al.* (1995), während weniger als die Hälfte der genomischen Sonden des Roggens Polymorphismen aufdeckten. Die genannten Beispiele zeigen, daß im Hinblick auf einen hohen Polymorphiegrad auch beim fremdbefruchtenden Roggen der Wahl einer geeigneten Kartierungspopulation Aufmerksamkeit geschenkt werden muß.

Einsatzmöglichkeiten einer dichten Genkarte in der Roggenzüchtung

Beispiele für die Nutzung genetischer Marker in der Roggenzüchtung sind von WRICKE (1996) eingehend beschrieben worden. Für die Anwendbarkeit ist die Aufspaltung des Markers bzw. der Marker und des betrachteten Gens erforderlich. Die zu bearbeitende Population muß sich zudem im Kopplungsungleichgewicht befinden und die Kopplungsphase bekannt sein. Einige Anwendungen setzen keine Information über die Kartenposition eines Markers voraus. Hierzu gehören die Schätzung von Selbstungs- und Auskreuzungsraten, die Kontrolle von Kreuzungen und die Differenzierung von Zuchtmaterial. Mit Hilfe der „bulked segregant analysis“ (MICHELMORE *et al.* 1991) können auf sehr schnelle Weise Marker gefunden werden, die mit dem Merkmalsgen gekoppelt sind. In phylogenetischen Studien, welche die Berechnung genetischer Distanzen zum Gegenstand haben, ist aber bereits die Kenntnis der Lage auf dem Chromosom oder dem Chromosomenarm eines Markers erwünscht, da eine höhere Aussagekraft erzielt wird, wenn voneinander unabhängige Merkmale herangezogen werden. Die chromosomale Zuordnung kann aber gegebenenfalls einfacher vorgenommen werden als durch genetische Kartierung. Eine möglichst umfassende Kopplungskarte ist jedoch unentbehrlich für die in Zukunft an Bedeutung gewinnende markergestützte Selektion (MAS). Bereits für die Analyse monogen vererbter Eigenschaften ist die Existenz einer Genkarte von Vorteil, da mit einem Satz gut verteilter Marker die chromosomale Region eingegrenzt werden kann. Die Erfassung von Chromosomenabschnitten bei oligogener und polygener Vererbung ist auf eine dicht besetzte Genkarte angewiesen. Für die Positionsbestimmung von Genen mit dem vorhandenen Angebot an Markertechniken wird folgende Strategie vorgeschlagen. Zunächst kann mit einfach zu analysierenden und kodominant ausgeprägten Markern wie SSRs und Isoenzymen eine Grobkartierung vorgenommen werden. Der interessierende Bereich muß dann mit RFLP-Markern weiter abgesättigt werden. Bereits in diesem Stadium kann sich eine ausreichend enge Kopplung ergeben. Im Falle eines größeren Abstands kann eine Markerklammer sinnvoll sein (WEBER und WRICKE 1994). Der Anteil der in den nachfolgenden Generationen auftretenden Rekombinanten ist bei Verwendung einer Markerklammer mit jeweils 20 cM zum Gen etwa genau so hoch, wie bei einem Marker, der etwa 6 cM vom Gen entfernt ist. Wird keine Interferenz zugrundegelegt, gilt die einfache Beziehung

$$r = \frac{r_1 r_2}{1 - r_1 - r_2 + 2r_1 r_2}.$$

Größere Abstände zwischen Marker und Gen bergen aber die Gefahr des „linkage drags“. Das bedeutet, daß durch Selektion auf das Markerintervall auch negative Eigenschaften, die mit dem erwünschten Gen gekoppelt sind, „mitgeschleppt“ werden. Für die Feinkartierung einer Region eignen sich vor allem AFLP-Marker. Sehr eng gekoppelte AFLP-Banden können dann in locus-spezifische PCR-Marker umgewandelt werden oder dienen als Stützpunkte für eine kartengestützte Isolierung von Genen. Durch die Feinkartierung mit AFLP-Markern gelang beispielsweise die Isolierung des *Mlo*-Gens aus Gerste, dessen rezessives Allel Resistenz gegen echten Mehltau vermittelt (BÜSCHGES *et al.* 1997). Quantitative Merkmale, also solche mit kontinuierlicher Ausprägung, unterliegen einer Vielzahl von Genen. In einem Kartierungsexperiment ist die Variation der Merkmalsgröße in der spaltenden Population annähernd als Normalverteilung zu beschreiben. In diesem Fall lassen sich mit Hilfe einer dichten Genkarte einzelne Markerintervalle, die als **Quantitative Trait Loci (QTLs)** bezeichnet werden, nachweisen, die signifikant zur Ausprägung beitragen. Aus der Analyse kann außerdem der Beitrag eines QTLs an der Gesamtvarianz, der genotypischen Varianz und ihrer Komponenten ermittelt werden. In der Literatur ist bis heute allerdings über kein QTL-Experiment bei Roggen berichtet worden. Eine Vielzahl von Merkmalen kann durch eine semi-qualitative Variation erklärt werden, die durch wenige Majorgene und modifizierende Minorgene verursacht wird. Ein Charakteristikum solcher Merkmale ist eine multimodale Verteilung der Ausprägung in einer spaltenden Population. Für solche Merkmale werden häufig nominale Daten (Bonituren) erhoben. Die Täler im Histogramm dienen der Abgrenzung und Bildung von Klassen, woraus eine Vererbungshypothese über die Zahl der beteiligten Majorgene abgeleitet werden kann (WRICKE 1996). Die übrige Variation kann nun separat betrachtet und in eine genetische und umweltbedingte Komponente unterteilt werden.

Nachfolgend werden einige der vordringlichen Zuchtziele bei Roggen aufgeführt und damit verbundene Anwendungsmöglichkeiten einer dicht besetzten Genkarte diskutiert. Unter zuchtmethodischen Gesichtspunkten spielt die Wiederherstellung der Pollenfertilität in dem auf cytoplasmatisch-männlicher Sterilität (cms) basierenden Hybridzuchtverfahren eine wichtige Rolle. Die genetische Analyse in den bisher untersuchten Populationen weist auf ein semi-qualitatives Merkmal hin, das durch ein oder zwei Majorgene kontrolliert wird (GEIGER und MIEDANER 1996). In Abhängigkeit von der Restorerlinie sind starke Restorerogene auf den Chromosomen 1R und 4R, und mäßige Restorerogene auf 3R, 5R und 6R gefunden worden. WRICKE *et al.* (1993) wiesen zum ersten Mal die Kopplung eines Restorergens mit dem Isoenzym *Per7* nach. Es liegt auf dem kurzen Arm von 1R. Bisher verwendete europäische Restorerquellen führen nur zu einer partiellen Restauration der Pollenfertilität. Exotische Populationen stellten sich als effektivere Restorerquellen heraus.

Ein in diesem Material auftretendes Restorer-gen konnten MIEDANER *et al.* (1997) mit einem eng gekoppelten RFLP-Marker auf dem langen Arm von 4R lokalisieren. Mit Hilfe eines PCR-gestützten Markers ließe sich die Einlagerung des Majorgens in fortgeschrittenes Zuchtmaterial beschleunigen, zumal die Bonitur umweltabhängig und nur in einem begrenzten Zeitraum möglich ist. Auch der Antherenkultureignung wird im Rahmen der Hybridzüchtung eine Bedeutung beigemessen. Die hohe Genotypenabhängigkeit dieses Merkmals im Kulturroggen verhinderte bislang die Anwendung der Antherenkultur für die Erzeugung von dihaploidem Ausgangsmaterial. Als geeigneter Träger von Genen für Antherenkultureignung hat sich die Wildart *Secale vavilovii* herausgestellt. Da jedoch die Rückkreuzung mit der Kulturart aufwendig und langwierig ist, verspricht eine marker-gestützte Selektion eine erhebliche Beschleunigung des Zuchtgangs. Dies gilt erst recht vor dem Hintergrund, daß Induktionsvermögen und Regenerationsfähigkeit unabhängig kontrolliert werden. Mit Hilfe von Markern können die wünschenswerten Allelkombinationen schneller und einfacher erhalten werden. In der Roggenzüchtung besteht außerdem Interesse an der Einlagerung von Resistenzgenen in anfälliges Sortenmaterial. An erster Stelle ist der im Winterroggen am häufigsten vorkommende Schadpilz, der Braunrost zu nennen. Es sind sowohl qualitative, als auch quantitative Resistenzen nachgewiesen worden (SPERLING *et al.* 1996). Im Hinblick auf die Züchtung ist die quantitative Resistenz aufgrund der hohen Heritabilität und der zwischen resistenten Linien und Testkreuzungsnachkommen beobachteten hohen Korrelation hinsichtlich des Resistenzverhaltens zu bevorzugen. Ein rascher Fortschritt ist deshalb bereits mit konventioneller Selektion zu erzielen, zumal eine schnelle Brechung dieser Form der Resistenz nicht zu erwarten ist. Eine Verzögerung kann auch durch „Pyramidisierung“ von mehreren qualitativen Resistenzgenen erreicht werden (MELCHINGER 1990). Diese läßt sich wiederum durch den Einsatz von Markern schneller bewerkstelligen. Ein dominantes Majorgen, das Resistenz gegen echten Mehltau bedingt, ist von WRICKE *et al.* (1996) mit Hilfe eines RFLP-Markers kartiert worden. Hier handelt es sich vermutlich um das gleiche Gen, das durch Translokation in den Weizen übertragen wurde. Als abschließendes Beispiel sei die Aluminiumtoleranz genannt, die in Gebieten mit sauren Mineralböden, vor allem in subtropischen Ländern von Bedeutung ist. Bisherige Untersuchungen zeigen, daß diese Eigenschaft von einem oder mehreren dominanten Genen kontrolliert wird (ANIOL und MADEJ 1996; GALLEGO und BENITO 1997). Da einfache Screening-Tests zur Bonitur des Merkmals bisher nicht zur Verfügung stehen, wäre die Nutzung eng gekoppelter genetischer Marker eine geeignete Alternative.

In diesem Zusammenhang sei noch auf die Relevanz des Roggen-genoms für die Übertragung wertvoller Eigenschaften auf den Weizen verwiesen. Auf die Bedeutung der intensiven Nutzung von Translokationen und Substitutionen des vollständig homoeologen

Chromosoms 1R hat BARTOŠ (1983) hingewiesen. Auch hier können markergestützte Verfahren die Erkennung wünschenswerter rekombinanter Genotypen erleichtern.

4.4 Maßzahlen für den Polymorphiegrad zur Bewertung von Markersystemen

Die Erfassung und Nutzung genetischer Variation innerhalb und zwischen Populationen ist eine unabdingbare Voraussetzung in der Pflanzenzüchtung und Populationsgenetik. Die limitierende Zahl der mit morphologischen Markern und Isoenzymen aufspürbaren Polymorphismen kann mit Hilfe molekularer Marker überwunden werden. Für eine vergleichende Bewertung von molekularen Markern ist es entscheidend, ob fremd- oder selbstbefruchtende Spezies betrachtet werden. Das hierfür am häufigsten benutzte Maß stellt der theoretisch zu erwartende Heterozygotiegrad (H) dar. Die Güte des Schätzwertes \hat{H} ist an die Voraussetzung geknüpft, daß er aus einer sich im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht befindenden Population gewonnen wird. Populationssorten von Fremdbefruchtern sind zwar einer mehr oder weniger starken Selektion ausgesetzt, doch die Bedingung ist näherungsweise erfüllt. Für selbstbefruchtende Populationen ist diese Annahme nicht sinnvoll. H wurde von NEI (1973) deshalb auch als „gene diversity“ oder „heterogeneity index“ bezeichnet. Dann entspricht H der Wahrscheinlichkeit, auf zwei nicht identische Allele in einer Population zu stoßen. In der jüngeren Literatur ist auch der Ausdruck PIC (polymorphic information content) zu finden (ANDERSON *et al.* 1993), der in seiner ursprünglichen Bedeutung eine erweiterte Fragestellung beinhaltet und eine zusätzliche Komponente enthält (BOTSTEIN *et al.* 1980). Wird H aus kleineren Stichproben geschätzt, ist eine Multiplikation von \hat{H} mit dem Faktor $2N/(2N-1)$ (N = Anzahl Individuen) erforderlich, da sonst eine stärkere Verzerrung des Schätzwertes die Folge ist. In dieser Form wird er auch als „Populationsdifferenzierung“ δ_t verwendet (GREGORIUS 1987). Die von NEI und ROYCHOUDHURY (1974) angegebene empirische Varianz von \hat{H} ist in vollständig ingezüchteten Populationen, wie sie praktisch bei Selbstbefruchtern auftreten, dahingehend abzuändern, daß die Anzahl der Individuen (N) an die Stelle der Allelzahl ($2N$) tritt. Anderenfalls ist ein Anstieg der Varianz zu erwarten. Das gleiche gilt bei Dominanz, wenn die Häufigkeit des rezessiven Allels sehr klein ist (NEI und ROYCHOUDHURY 1974). Für die Beschreibung der Variation einer Population ist es nützlich, mehrere Loci in die Untersuchung einzubeziehen. Der durchschnittliche Heterozygotiegrad \hat{H}_{AV} wird einfach durch Mittelung über alle Werte der einzelnen Loci erhalten.

Für die Berechnung der Varianz ist zu beachten, daß sich die untersuchten Loci im Kopplungsgleichgewicht befinden. NEI und ROYCHOUDHURY (1974) zeigen, daß ein präziserer Schätzwert für den durchschnittlichen Heterozygotiegrad mit einer kleinen Individuenzahl und einer großen Anzahl von Loci erreicht wird. Es ist das Ziel von Untersuchungen, verschiedene molekulare Marker auf ihre Eignung zur Beschreibung der

Diversität einer Population oder eines Sortenspektrums zu überprüfen und die mit ihnen ermittelten genetischen Distanzen im Hinblick auf die Differenzierung von Linien und Sorten zu vergleichen. In solchen Untersuchungen werden häufig nicht polymorphe Loci bei der Berechnung des durchschnittlichen Polymorphiegrads ausgeschlossen. Da aber in Multilocus-Markernsystemen wie RAPDs und AFLPs immer auch nicht polymorphe Loci nachgewiesen werden, schlagen POWELL *et al.* (1996) eine gewichtete Form von \hat{H}_{AV} vor: $\hat{H}_{AV} = \beta \sum \hat{H}_p / n_p$. Hierbei entspricht β dem Anteil polymorpher Loci $n_p / (n_p + n_{np})$, wobei n_p der Anzahl polymorpher und n_{np} der Anzahl nicht polymorpher Loci entspricht. Den mit RAPDs und AFLPs verbundenen Vorteil der simultanen Detektion mehrerer Loci berücksichtigten POWELL *et al.* (1996) in einer neuen, als Marker-Index bezeichneten Maßzahl MI : $MI = n\hat{H}_{AV}$, wobei $E = n\beta$ auch als effektives Multiplex-Verhältnis definiert ist. Auch hier gilt die Voraussetzung, daß die n Loci voneinander unabhängig sind. Beträgt beispielsweise bei einer AFLP-Primerkombination der Anteil polymorpher Loci 0,2 und die Anzahl Banden 80, liegt ein effektives Multiplex-Verhältnis von 16 vor. Die häufig beobachtete Clusterbildung von AFLP-Loci würde allerdings der Forderung der Unabhängigkeit widersprechen. Auch der von RUSSELL *et al.* (1997) verwendete „diversity index“ berücksichtigt die Anzahl Loci, die mit einer Probeneinheit erzeugt werden kann. Eine Probeneinheit entspricht bei RFLPs einer Sonden/Enzym-Kombination, einem Primerpaar bei SSRs sowie einem Primer bzw. einer Primerkombination bei RAPDs und AFLPs. Anstelle der Allelhäufigkeit geht dann die relative Häufigkeit eines mit einer Probeneinheit (Gelspur) erhaltenen Phänotyps in die Berechnung ein.

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zeigen ein unterschiedliches Potential der einzelnen Markerklassen zur Aufdeckung von Variabilität in Populationsorten des Roggens. RAPD-Loci weisen, bedingt durch die dominante Vererbung, die niedrigsten Werte von \hat{H} , PIC und \hat{k}_e auf. Die relativ hohen Zahlen für die RFLP- und SSR-Marker in der vorliegenden Untersuchung deuten auf die noch in beiden Hochleistungssorten vorhandene große Variation hin. Nur in der Sorte 'Danko' vermögen SSRs einen noch höheren Polymorphiegrad aufzudecken. Ein abschließendes Urteil über einen möglichen Unterschied in der genetischen Variation zwischen den beiden Sorten ist aber auf der Grundlage der zu geringen Zahl untersuchter Marker nicht möglich. Eine eventuelle Überlegenheit von SSR-Markern könnte sich aber in exotischen Populationen zeigen. MÖRCHEN *et al.* (1996) berichten über eine in Kultur- und Wildformen der Zuckerrübe hohe Variabilität, die von SSR- und RFLP-Markern gleichermaßen nachgewiesen wurde. Damit würde bei Fremdbefruchtern vor allem der methodische Vorteil von SSR-Markern überwiegen.

In den meisten Arbeiten, die den Vergleich von molekularen Markern zum Gegenstand haben, bedienen sich die Forscher ausgewählter Inzuchtlinien, die einen Ausschnitt des für

die Züchtung interessanten Ausgangsmaterials repräsentieren. Ziel solcher Untersuchungen ist dann nicht die Differenzierung von Populationen, sondern vorteilhafte Markertechniken in die zukünftige Zuchtplanung miteinzubeziehen. Die dabei ermittelten Werte für die genetische Diversität können daher nicht mehr als Schätzwerte für die wahre Größe der Maßzahl angesehen werden. Für die Züchtung von Mais als bedeutendstem Vertreter fremdbefruchtender Kulturpflanzen sind Inzuchtlinien das bevorzugte Untersuchungsmaterial für die Bewertung des Informationsgehaltes der einzelnen Markerklassen. Für RFLP-Marker ermittelten TARAMINO und TINGEY (1996) in 12 Inzuchtlinien aus dem gegenwärtigen nordamerikanischen Spektrum einen Wert für \hat{H}_{AV} von 0,58. In dem gleichen Material wiesen SSR-Marker Werte zwischen 0,73 und 0,79 auf. SMITH *et al.* (1997) führten eine ähnliche Untersuchung mit 115 SSR- und 80 RFLP-Markern an 58 Mais-Inzuchtlinien durch und gelangten mit beiden Markerklassen zu einem \hat{H}_{AV} -Wert von etwa 0,62. Die auf beiden Markerklassen beruhenden Stammbäume zeigten untereinander und mit der auf Abstammungsdaten basierenden Phylogenie eine gute Übereinstimmung. Die Autoren sehen in der SSR-Markertechnologie eine kostengünstige und verlässliche Alternative zur RFLP-Methodik im Hinblick auf die Differenzierung des in den USA vorhandenen Linienspektrums. Die Möglichkeiten der einzelnen Markersysteme zur Differenzierung von Sorten und Inzuchtlinien bei Selbstbefruchtern und die Konsequenzen für die Abschätzung der genetischen Verwandtschaft sollen exemplarisch an der Sojabohne und der Gerste gezeigt werden. Einen ausführlichen Vergleich von RFLP-, RAPD-, AFLP- und SSR-Markern zur Beschreibung der Diversität von Herkünften der Kultursojabohne (*Glycine max*) und der Wildsojabohne (*Glycine soja*) führten POWELL *et al.* (1996) durch. Die untersuchten 12 Genotypen repräsentieren 92 % des nordamerikanischen Sorten-spektrums. Die Autoren ermittelten für SSRs den höchsten durchschnittlichen Heterozygotiegrad (0,60), während der von ihnen vorgeschlagene Marker-Index *MI* für AFLP-Marker maximal ist. Das hohe Auflösungsvermögen von SSR-Markern spiegelt der niedrige Wert von 0,34 für die mittlere genetische Ähnlichkeit zwischen den Genotypen wider, während alle anderen Markerklassen eine nahezu doppelt so hohe Ähnlichkeit gemessen haben. SSRs scheinen sich daher zur Differenzierung von sehr eng verwandten Taxa zu eignen. Trotzdem gelang es auch mit SSR-Markern, die beiden Spezies auf der Basis der genetischen Ähnlichkeit deutlich voneinander abzugrenzen. Allerdings war *G. soja* in dieser Untersuchung nur mit zwei Genotypen vertreten. Eine hohe Korrelation zwischen den Dendrogrammen, die mit den einzelnen Markerklassen erzeugt worden sind, bestand, wenn beide Spezies miteinbezogen wurden. Hingegen zeigten die Dendrogramme auf der Basis der *G. max*-Genotypen nur eine schwache Übereinstimmung. AFLP-Marker waren in der Lage, die geographischen Herkünfte der Genotypen der Kultursojabohne im Dendrogramm wiederzugeben. Die hohe Varianz der mit RAPD-Markern ermittelten genetischen Distanz führen POWELL *et al.* (1996) auf methodische

Fehlerquellen zurück. So werden bei RAPDs Fehlpaarungen am 5'-Ende eher toleriert als am 3'-Ende. Außerdem besteht, ähnlich wie bei AFLPs, die Gefahr der Überschätzung der Verwandtschaft, wenn komigrierende nicht-homologe Banden als identisch eingestuft werden. Untersuchungen an 18 europäischen Sommer- und Wintergerstensorten bestätigen den hohen Polymorphiegrad von SSRs gegenüber anderen Markerklassen (RUSSELL *et al.* 1997). Von den SSR-Loci waren alle polymorph, von den RFLP-Banden immerhin 83,2 %. Jedoch wurde der höchste „diversity index“ bei AFLP-Markern gefunden, die 46,8 % polymorphe Banden erzeugten bei durchschnittlich 49,5 Loci je Primerkombination. Die SSRs zeigen wie bei der Soja-bohne im Mittel die niedrigsten Ähnlichkeitswerte und die AFLP-Marker die höchsten. Zwar lassen sich mit allen Markerklassen Wintergersten von Sommergersten trennen, doch war mit SSR-Markern keine Gruppierung innerhalb der Wintergerstentypen möglich. Die Autoren betonen, daß sich SSRs aufgrund der geringen Übereinstimmung in den Allelen innerhalb einer Gruppe nicht besonders gut für Abstammungsuntersuchungen eignen. Markergestützte Schätzungen der genetischen Ähnlichkeit sind dennoch aufgrund ihrer größeren Information gegenüber Ähnlichkeitsberechnungen aus Abstammungsdaten zu bevorzugen.

5. Zusammenfassung

Für die Kartierung und Markierung von Genen, die für die Ausprägung qualitativer und quantitativer Eigenschaften verantwortlich sind, ist in vielen Fällen eine dicht besetzte Kopplungskarte erforderlich. Vordringliche Ziele der Roggenzüchtung, wie die vollständige Restauration der Pollenfertilität als Grundlage für die Züchtung von Hybridsorten und die Erzeugung doppelhaploider Linien, können mit Hilfe genetischer Marker schneller und effektiver bearbeitet werden.

Ziel dieser Arbeit war es, neben der Kartierung weiterer RFLP- und RAPD-Marker neue PCR-gestützte Markertechniken für die Erweiterung und Absättigung der am Institut für Angewandte Genetik, Universität Hannover, entwickelten Genkarte zu nutzen. Im Mittelpunkt stand die Entwicklung von SSR-Markern (simple sequence repeats) und die Kartierung von AFLP-Markern (Amplifikationsfragment-Längenpolymorphismen).

Von 182 aus genomischen DNA-Bibliotheken isolierten SSRs, welche die Motive $(GT/CA)_n$ und $(CT/GA)_n$ enthielten, sind 74 Klone sequenziert worden. 56,8 % der SSRs stellten perfekte Motive dar, von denen 62 % vom Typ $(GT/CA)_n$ waren und 38 % das $(CT/GA)_n$ -Motiv trugen. Von 57 entwickelten Primerpaaren erzeugten 27 spezifische Amplifikate im erwarteten Größenbereich. Zwölf dieser SSR-Marker sind genetisch kartiert worden, für acht weitere SSRs erfolgte eine Zuordnung mit Hilfe von disomen und ditelosomen Additionslinien zu Chromosomen oder Chromosomenarmen. Mit Ausnahme von Chromosom 4R sind alle Chromosomen mit mindestens 2 SSR-Markern besetzt. Der Polymorphiegrad von SSR-Markern war im Vergleich zu RFLP-, RAPD- und AFLP-Markern in der hier verwendeten Kartierungspopulation am höchsten. Von sechs bereits vorselektierten SSRs des Weizens konnte nur ein SSR-Marker kartiert werden. Diese und andere Untersuchungen zeigen, daß die Übertragbarkeit von SSR-Markern zwischen Arten der *Triticeae* stark eingeschränkt ist.

Im Rahmen der Kartierung von AFLP-Markern sind 18 *EcoRI/MseI*-Primerkombinationen auf Polymorphismus überprüft worden. Von etwa 1180 analysierten Banden waren 148 polymorph. Es wurden Polymorphiegrade zwischen 5,7 % und 33,3 % gefunden, die keine Abhängigkeit vom verwendeten *EcoRI*- oder *MseI*-Primer zeigten. Aus den 8 Primerkombinationen mit dem höchsten Polymorphiegrad gingen 80 polymorphe Loci hervor, von den 74 kartiert werden konnten. An einigen chromosomalen Regionen treten dichtere Ansammlungen (Cluster) mit AFLP-Markern auf, die aber nicht aus einer oder wenigen Primerkombinationen resultierten. Wie erste Untersuchungen ergaben (ROUPPE VAN DER VOORT *et al.* 1997), besteht in einem hohen Maße Sequenzhomologie zwischen komigrierenden Banden, so daß eine Übertragbarkeit von AFLP-Markern auf andere Populationen möglich erscheint.

Nach Integration von Isoenzym- und RFLP-Markern anderer Populationen umfaßt die Kopplungskarte 226 Marker mit einer Gesamtlänge von etwa 1380 cM. Dies entspricht vermutlich einer Genomabdeckung von etwa 80 %. Darin enthalten sind 2 morphologische Marker, 19 Isoenzym-, 88 RFLP-, 29 RAPD-, 14 SSR- und 74 AFLP-Marker. Daraus ergibt sich ein durchschnittlicher Markerabstand von 6,1 cM.

In den beiden Populationssorten `Halo´ und `Danko´ wurden Polymorphiegrade von RFLP-, SSR- und RAPD-Markern ermittelt. Bei RAPD-Markern lag der durchschnittlich zu erwartende Heterozygotiegrad in beiden Sorten mit 0,30 niedriger als bei RFLP- und SSR-Markern (0,43 bzw. 0,61). SSR-Marker deckten in beiden Sorten mehr Polymorphismen als RFLPs auf. Ein statistisch signifikanter Unterschied konnte aber nur in der Sorte `Danko´ gefunden werden.

Einsatzmöglichkeiten einer genetischen Karte in der Roggenzüchtung sowie die Eignung verschiedener Markersysteme zur Beschreibung der Variation einer Population werden diskutiert. Bei Fremdbefruchtern wie Roggen liegt ein wesentlicher Vorteil von SSR-Markern gegenüber RFLPs in der einfachen und schnellen Analyse.

6. Literatur

AKKAYA, M.S., A.A. BHAGWAT und P.B. CREGAN (1992): Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. *Genetics* **132**, 1131-1139.

ANDERSON, J.A., G.A. CHURCHILL, J.E. AUTRIQUE, S.D. TANKSLEY und M.E. SORRELLS (1993): Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome* **36**, 181-186.

ANIOL, A. und L. MADEJ (1996): Genetic variation for aluminium tolerance in rye. *Vortr. Pflanzenzüchtg.* **35**, 201-211.

ARUMUGANATHAN, K. und E.D. EARLE (1991): Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol. Biol. Rep.* **9**, 208-218.

BALLVORA, A., J. HESSELBACH, J. NIEWÖHNER, D. LEISTER, F. SALAMINI und C. GEBHARDT (1995): Marker enrichment and high-resolution map of the segment of potato chromosome VII harbouring the nematode resistance gene *Gro1*. *Mol. Gen. Genet.* **249**, 82-90.

BARTOŠ, P. (1983): Chromosome 1R of rye in wheat breeding. *Plant Breeding Abstr.* **63**, 1203-1211.

BECKER, J und M. HEUN (1995): Barley microsatellites: allele variation and mapping. *Plant Mol. Biol.* **27**, 835-845.

BECKER, J., P. VOS, M. KUIPER, F. SALAMINI und M. HEUN (1995): Combined mapping of AFLP and RFLP markers in barley. *Mol. Gen. Genet.* **249**, 65-73.

BELL, C.J. und J.R. ECKER (1994): Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of *Arabidopsis*. *Genomics* **19**, 137-144.

BENNETT, M.D. und J.B. SMITH (1976): Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Philos. Trans. R. Soc. London B Biol. Sci.* **274**, 227-274.

BEYERMANN, B., P. NÜRNBERG, A. WEIHE, M. MEIXNER, J.T. EPPLEN und T. BÖRNER (1992): Fingerprinting plant genomes with oligonucleotide probes specific for simple repetitive DNA sequences. *Theor. Appl. Genet.* **83**, 691-694.

BIEBLER, K.-E. und B. JÄGER (1987): Confidence estimation of allele probabilities. *EDV in Medizin und Biologie* **18**, 25-29.

BIEBLER, K.-E. und B. JÄGER (1996): Punkt- und Konfidenzschätzungen von Allelwahrscheinlichkeiten. In: H. SIMIANER u.a. (Hrsg.): *Biometrische Aspekte der Genomanalyse*, 19-42. GinkgoPark Mediengesellschaft, Gützkow.

- BOTSTEIN, D., R.L. WHITE, M. SKOLNICK und R.W. DAVIS (1980): Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* **32**, 314-331.
- BRESLAUER, K.J., R. FRANK, H. BLOCKER und L.A. MARKEY (1986): Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 3746-3750.
- BRYAN, G.J., A.J. COLLINS, P. STEPHENSON, A. ORRY, J.B. SMITH und M.D. GALE (1997): Isolation and characterisation of microsatellites from hexaploid bread wheat. *Theor. Appl. Genet.* **94**, 557-563.
- BÜSCHGES, R., K. HOLLRICHER, R. PANSTRUGA, G. SIMONS, M. WOLTER, A. FRIJTERS, R. VAN DAELEN, T. VAN DER LEE, P. DIERGAARDE, J. GROENENDIJK, S. TÖPSCH, P. VOS, F. SALAMINI und P. SCHULZE-LEFERT (1997): The barley *Mlo* gene: A novel control element of plant pathogen resistance. *Cell* **88**, 695-705.
- CAUSSE, M.A., T.M. FULTON, Y.G. CHO, S.N. AHN, J. CHUNWONGSE, K.S. WU, J.H. XIAO, Z.H. YU, P.C. RONALD, S.E. HARRINGTON, G. SECOND, S.R. McCOUCH und S.D. TANKSLEY (1994): Saturated molecular map of the rice genome based on an interspecific backcross population. *Genetics* **138**, 1251-1274.
- CHEN, X., S. TEMNYKH, Y. XU, Y.G. CHO und S.R. McCOUCH (1997): Development of a microsatellite framework map providing genome-wide coverage in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* **95**, 553-567.
- CONDIT, R. und S.P. HUBBELL (1991): Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genomes. *Genome* **34**, 66-71.
- DEIMLING, S., B.A. GROSSE und H.H. GEIGER (1997): Methodik und Genetik der Antherenkultur bei Roggen. *Votr. Pflanzenzüchtg.* **38**, 287-301.
- DEVOS, K.M. und M.D. GALE (1992): The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat. *Theor. Appl. Genet.* **84**, 567-572.
- DEVOS, K.M., M.D. ATKINSON, C.N. CHINOY, C.J. LIU und M.D. GALE (1992): RFLP-based genetic map of the homoeologous group 3 chromosomes of wheat and rye. *Theor. Appl. Genet.* **83**, 931-939.
- DEVOS, K.M., T. MILLAN und M.D. GALE (1993a): Comparative RFLP maps of the homoeologous group-2 chromosomes of wheat, rye and barley. *Theor. Appl. Genet.* **85**, 784-792.

- DEVOS, K.M., M.D. ATKINSON, C.N. CHINOY, H.A. FRANCIS, R.L. HARTCOURT, R.M.D. KOEBNER, C.J. LIU, P. MASOJC, D.X. XIE und M.D. GALE (1993b): Chromosomal rearrangements in the rye genome relative to that of wheat. *Theor. Appl. Genet.* **85**, 673-680.
- DEVOS, K.M., G.J. BRYAN, A.J. COLLINS, P. STEPHENSON und M.D. GALE (1995): Application of two microsatellite sequences in wheat storage proteins as molecular markers. *Theor. Appl. Genet.* **90**, 247-252.
- DONINI, P., M.L. ELIAS, S.M. BOUGOURD und R.M.D. KOEBNER (1997): AFLP fingerprinting reveals pattern differences between template DNA extracted from different plant organs. *Genome* **40**, 521-526.
- EASTWOOD, R.F., E.S. LAGUDAH und R APPELS (1993): A directed search for DNA sequences tightly linked to cereal cyst nematode resistance genes in *Triticum tauschii*. *Genome* **37**, 311-319.
- ECHT, C.S. und P. MAY-MARQUARDT (1997): Survey of microsatellite DNA in pine. *Genome* **40**, 9-17.
- EVOLA, S.V., F.A. BURR und B. BURR (1986): The suitability of restriction fragment length polymorphisms as genetic markers in maize. *Theor. Appl. Genet.* **71**, 765-771.
- FEINBERG, A.P. und B. VOGELSTEIN (1983): A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**, 6-13.
- FEINBERG, A.P. und B. VOGELSTEIN (1984): Addendum: A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **137**, 266-267.
- FLAVELL, R.B., M.D. BENNETT, J.B. SMITH und D.B. SMITH (1974): Genome size and the proportion of repeated nucleotide sequence DNA in plants. *Biochem. Genet.* **12**, 257-269.
- GALLEGO, F.J. und C. BENITO (1997): Genetic control of aluminium tolerance in rye (*Secale cereale* L.). *Theor. Appl. Genet.* **95**, 393-399.
- GEIGER, H.H. und T. MIEDANER (1996): Genetic basis and phenotypic stability of male fertility restoration in rye. *Vortr. Pflanzenzüchtg.* **35**, 27-38.
- GERTZ, A. und G. WRICKE (1988): Linkage between the incompatibility locus Z and a β -Glucosidase locus in rye. *Plant Breeding* **102**, 255-259.
- GIRALDEZ, R., M.C. CERMEÑO und J. ORELLANA (1979): Comparison of C-banding pattern in the chromosomes of inbred lines and open pollinated varieties of rye. *Z. Pflanzenzüchtg.* **83**, 40-48.

- GOODMAN, M.M. und C.W. STUBER (1983): Maize. In: S.D. TANKSLEY und T.J. ORTON (eds.) *Isozymes in Plant Genetics and Breeding Part B*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1-33.
- GRANER, A., A. JAHOR, J. SCHONDELMAIER, H. SIEDLER, K. PILLEN, G. FISCHBECK, G. WENZEL und R.G. HERRMANN (1991): Construction of an RFLP map of barley. *Theor. Appl. Genet.* **83**, 250-256.
- GREGORIUS, H.-R. (1987): The relationship between the concepts of genetic diversity and differentiation. *Theor. Appl. Genet.* **74**, 397-401.
- GROBEN, R. (1997): Mikrosatelliten bei der Zuckerrübe (*Beta vulgaris* L.) und ihre Verwendung als molekulare Marker. Dissertation, Universität Hannover.
- HAMADA, H., M.G. PETRINO und T. KAKUNAGA (1982): A novel repeated element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionary diverse eukaryotic genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 6465-6469.
- HANAHAN, D. (1985): Techniques for transformation of *E. coli*. In: GLOVER, D.M. (ed.): *DNA cloning Vol. 1 - a practical approach*. IRL Press, Oxford, Washington, 109-135.
- HART, G.E. und M.D. GALE (1988): Guideline for nomenclature of biochemical/molecular loci in wheat and related species. In: MILLER, T.E. und R.M.D. KOEBNER (eds.), *Proc. 7th Int. Wheat Genet. Symp.*, Institute of Plant Science Research, Cambridge, 1215-1218.
- HARTL, D.L. und A.G. CLARK (1989): *Principles of Population Genetics*, 2nd edition. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- HEDRICK, P.W. (1985): *Genetics of populations*. Jones & Bartlett Publ. Inc., Boston, Portola Valley.
- HEUN, M., A.E. KENNEDY, J.A. ANDERSON, N.L.V. LAPITAN, M.E. SORRELLS und S.D. TANKSLEY (1991): Construction of a restriction fragment length polymorphism map for barley (*Hordeum vulgare*). *Genome* **34**, 437-447.
- JENSEN, J. und J.H. JORGENSEN (1975): The barley chromosome 5 linkage map. I. Literature survey and map estimation procedure. *Hereditas* **80**, 6-16.
- JONES, C.J., K.J. EDWARDS, S. CASTAGLIONE, M.O. WINFIELD, F. SALA, C. VAN DE WIEL, G. BREDEMEIJER, B. VOSMAN, M. MATTHES, A. DALY, R. BRETTSCHEIDER, P. BETTINI, M. BUIATTI, E. MAESTRI, A. MALCEVSCHI, N. MARMIROLI, R. AERT, G. VOLCKAERT, J. RUEDA, R. LINACERO, A. VAZQUEZ und A. KARP (1997): Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Mol. Breeding* **3**, 381-390.

- JONES, G.H. (1978): Giemsa C-banding of rye meiotic chromosomes and the nature of „terminal“ chiasmata. *Chromosoma* **66**, 45-57.
- JONES, G.H. (1987): Chiasmata. In: MOENS, P.B. (ed.): *Meiosis*. Academic Press, Inc., Orlando, 213-244.
- KEIM, P., J.M. SCHUPP, S.E. TRAVIS, K. CLAYTON, T. ZHU, L. SHI, A. FERREIRA und D.M. WEBB (1997): A high-density soybean genetic map based on AFLP markers. *Crop Sci.* **37**, 537-543
- KIJAS, J.M.H., J.C.S. FOWLER, C.A. GARBETT und M.R. THOMAS (1994): Enrichment of microsatellites from the *Citrus* genome using biotinylated oligonucleotide sequences bound to Streptavidin-coated magnetic particles. *Biotechniques* **16**, 657-662.
- KOCHERT, G. (1994): RFLP technology. In: R.L. PHILLIPS und I.K. VASIL: *DNA-based markers in plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 8-38.
- KORZUN, V., S. MALYSHEV, N. KARTEL, T. WESTERMANN, W.E. WEBER und A. BÖRNER (1997): A genetic linkage map of rye (*Secale cereale* L.). *Theor. Appl. Genet.*, im Druck.
- KRESOVICH, S., A.K. SZEWC-McFADDEN, S.M. BLIEK und J.R. McFERSON (1995): Abundance and characterization of simple-sequence repeats (SSRs) isolated from a size-fractionated genomic library of *Brassica napus* L. (rapeseed). *Theor. Appl. Genet.* **91**, 206-211.
- LAGERCRANTZ, U., H. ELLEGREN und L. ANDERSSON (1993): The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. *Nucl. Acids Res.* **21**, 1111-1115.
- LANDER, E.S., P. GREEN, J. ABRAHAMSON, A. BARLOW, M. DALY, S. LINCOLN und L. NEWBURG (1987): MAPMAKER: An interactive computer package for constructing primary linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* **1**, 174-181.
- LANGRIDGE, P., P. ROGOWSKY, U. LANGRIDGE, C. TAYLOR, K. SHEPHERD, I. DUNDAS und J. LIANG-HUI (1993): Molecular mapping of rye chromosomes 1RS and 6RL. *Proc. 3rd Publ. Workshop Int. Trit. Mapp. Init. (ITMI), CIMMYT Mexico*, 19-22.
- LEE, S.J., G.A. PENNER und K.M. DEVOS (1995): Characterization of loci containing microsatellite sequences among Canadian wheat cultivars. *Genome* **38**, 1037-1040.
- LITT, M. und J.A. LUTY (1989): A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.* **44**, 397-401.

- LIU, C.J., M.D. ATKINSON, C.N. CHINOY, K.M. DEVOS und M.D. GALE (1992): Nonhomoeologous translocations between group 4, 5 and 7 chromosomes within wheat and rye. *Theor. Appl. Genet.* **83**, 305-312.
- LIU, Z.-W., R.M. BIYASHEV und M.A. SAGHAI MAROOF (1996): Development of simple sequence repeat DNA markers and their integration into a barley linkage map. *Theor. Appl. Genet.* **93**, 869-876.
- LOARCE, Y., G. HUEROS und E. FERRER (1996): A molecular linkage map of rye. *Theor. Appl. Genet.* **93**, 1112-1118.
- LUKASZEWSKI, A.J. (1992): A comparison of physical distribution of recombination in chromosome 1R in diploid rye and in hexaploid triticale. *Theor. Appl. Genet.* **83**, 1048-1053.
- MA, Z.Q., M. RÖDER und M. SORRELLS (1996): Frequencies and sequence characteristics of di-, tri-, and tetra-nucleotide microsatellites in wheat. *Genome* **39**, 123-130.
- MACKILL, D.J., Z. ZHANG, E.D. REDOÑA und P.M. COLOWIT (1996): Level of polymorphism and genetic mapping of AFLP markers in rice. *Genome* **39**, 969-977.
- MANNING, K. (1991): Isolation of nucleic acids from plants by differential solvent precipitation. *Anal. Biochem.* **195**, 45-50.
- MEKSEM, K., D. LEISTER, J. PELEMAN, M. ZABEAU, F. SALAMINI und C. GEBHARDT (1995): A high-resolution map of the vicinity of the *R1* locus on chromosome V of potato based on RFLP and AFLP markers. *Mol. Gen. Genet.* **249**, 74-81.
- MELCHINGER, A.E. (1990): Use of molecular markers in breeding for oligogenic disease resistance. *Plant Breeding* **104**, 1-19.
- MICHELMORE, R.W., I. PARAN und R.V. KESSELI (1991): Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 9828-9832.
- MIEDANER, T., F. DREYER, C. GLASS, H. REINBOLD und H.H. GEIGER (1997): Kartierung von Genen für die Pollenfertilitätsrestoration bei Roggen (*Secale cereale* L.). *Votr. Pflanzenzüchtg.* **38**, 303-314.
- MÖRCHEN, M., J. CUGUEN, G. MICHAELIS, C. HÄNNI und P. SAUMITOU-LAPRADE (1996): Abundance and length polymorphism of microsatellite repeats in *Beta vulgaris* L.. *Theor. Appl. Genet.* **92**, 326-333.

- MORGANTE, M. und A.M. OLIVIERI (1993): PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant J.* **3**, 175-182.
- MORTON, N.E. (1955): Sequential tests for the detection of linkage. *Am. J. Hum. Genet.* **7**, 277-318.
- NANDI, S., P.K. SUBUDHI, D. SENADHIRA, N.L. MANIGBAS, S. SEN-MANDI und N. HUANG (1997): Mapping QTLs for submergence tolerance in rice by AFLP analysis and selective genotyping. *Mol. Gen. Genet.* **255**, 1-8.
- NEI, M. (1973): Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**, 3321-3323.
- NEI, M. und A.K. ROYCHOUDHURY (1974): Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. *Genetics* **76**, 379-390.
- OSTRANDER, E.A., P.M. JONG, J. RINE und G. DUYK (1992): Construction of small-insert genomic DNA libraries highly enriched for microsatellite repeat sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 3419-3423.
- PAKNIYAT, H., W. POWELL, E. BAIRD, L.L. HANDLEY, D. ROBINSON, C.M. SCRIMGEOUR, E. NEVO, C.A. HACKETT, P.D.S. CALIGARI und B.P. FORSTER (1997): AFLP variation in wild barley (*Hordeum spontaneum* C. Koch) with reference to salt tolerance and associated ecogeography. *Genome* **40**, 332-341.
- PANAUD, O., X. CHEN und S.R. McCOUCH (1995): Frequency of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Genome* **38**, 1170-1176.
- PHILIPP, U. (1992): Erstellung einer genetischen Karte beim Roggen (*Secale cereale* L.) mit Hilfe molekularer Marker. Dissertation, Universität Hannover.
- PHILIPP, U., P. WEHLING und G. WRICKE (1994): A linkage map of rye. *Theor. Appl. Genet.* **88**, 243-248.
- PLASCHKE, J., A. BÖRNER, D.X. XIE, R.M.D. KOEBNER, R. SCHLEGEL und M.D. GALE (1992): RFLP mapping of genes affecting plant height and growth habit in rye. *Theor. Appl. Genet.* **85**, 1049-1054.
- PLASCHKE, J., A. BÖRNER, K. WENDEHAKE, M.W. GANAL und M.S. RÖDER (1996): The use of wheat aneuploids for the chromosomal assignment of microsatellite loci. *Euphytica* **89**, 33-40.
- POWELL, W., M. MORGANTE, C. ANDRE, M. HANAFEY, J. VOGEL, S. TINGEY und A. RAFALSKI (1996): The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Mol. Breeding* **2**, 225-238.

- QI, X. und P. LINDHOUT (1997): Development of AFLP markers in barley. *Mol. Gen. Genet.* **254**, 330-336.
- REES, H. (1955): Genotypic control of chromosome behaviour in rye. I. Inbred lines. *Heredity* **9**, 93-116.
- RIEDE, C.R., D.J. FAIRBANKS, W.R. ANDERSEN, R.L. KEHRER und L.R. ROBISON (1994): Enhancement of RAPD analysis by restriction endonuclease digestion of template DNA in wheat. *Plant Breeding* **113**, 254-257.
- RÖDER, M.S., J. PLASCHKE, S.U. KÖNIG, A. BÖRNER, M.E. SORRELLS, S.D. TANKSLEY und M.W. GANAL (1995): Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. *Mol. Gen. Genet.* **246**, 327-333.
- ROGNLI, O.A., K.M. DEVOS, C.N. CHINOY, R.L. HARCOURT, M.D. ATKINSON und M.D. GALE (1992): RFLP mapping of rye chromosome 7R reveals a highly translocated chromosome relative to wheat. *Genome* **35**, 1026-1031.
- ROUPPE VAN DER VOORT, J.N.A.M., P. VAN ZANDVOORT, H.J. VAN ECK, R. FOLKERTSMA, R.C.B. HUTTEN, J. DRAAISTRA, F.J. GOMMERS, E. JACOBSEN, J. HELDER und J. BAKKER (1997): Use of allele specificity of comigrating AFLP markers to align genetic maps from different potato genotypes. *Mol. Gen. Genet.* **255**, 438-447.
- RUSSELL, J.R., J.D. FULLER, M. MACAULAY, H.G. HATZ, A. JAHOR, W. POWELL und R. WAUGH (1997): Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. *Theor. Appl. Genet.* **95**, 714-722.
- RYCHLIK, W. und R.E. RHOADS (1989): A computer program for choosing optimal oligo-nucleotides for filter hybridization, sequencing and in vitro amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* **17**, 8543-8551.
- SAAL, B. und G. WRICKE (1997): Erstellung einer dicht besetzten Kopplungskarte mit Hilfe molekularer Marker beim Roggen (*Secale cereale* L.). *Votr. Pflanzenzüchtg.* **38**, 267-285.
- SALINAS, J. und BENITO, C. (1984): Phosphatase isozymes in rye. Genetic control and chromosomal location. *Z. Pflanzenzüchtg.* **93**, 115-137.
- SAMBROOK, J., E.F. FRITSCH und T. MANIATIS (1989): *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York.
- SCHLEGEL, R. und G. MELZ (1996): Genetic linkage map of rye (*Secale cereale* L.), *Votr. Pflanzenzüchtg.* **35**, 311-321.

- SCHONDELMAIER, J., G. STEINRÜCKEN und C. JUNG (1996): Integration of AFLP markers into a linkage map of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Plant Breeding* **115**, 231-237.
- SENFT, P. (1996): Erweiterung der genetischen Kopplungskarte und Markierung wirtschaftlich wichtiger Gene bei Roggen (*Secale cereale* L.). Dissertation, Universität Hannover.
- SENFT, P. und G. WRICKE (1996): An extended genetic map of rye (*Secale cereale* L.). *Plant Breeding* **115**, 508-510.
- SENIOR, M.L. und M. HEUN (1993): Mapping maize microsatellites and polymerase chain reaction confirmation of the targeted repeats using a CT primer. *Genome* **36**, 884-889.
- SHARP, P.J., M. KREIS, P.R. SHEWRY und M.D. GALE (1988): Location of β -amylase sequences in wheat and its relatives. *Theor. Appl. Genet.* **75**, 286-290.
- SMITH, J.S.C., E.C.L. CHIN, H. SHU, O.S. SMITH, S.J. WALL, M.L. SENIOR, S.E. MITCHELL, S. KRESOVICH und J. ZIEGLE (1997): An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.): comparisons with data from RFLPs and pedigree. *Theor. Appl. Genet.* **95**, 163-173.
- SPERLING, U., B. LESSNER, M. SCHOLZ, P. WEHLING, A.-K. GEY, H.H. GEIGER und T. MIEDANER (1996): Quantitative and qualitative variation for resistance of winter rye to leaf rust. *Vortr. Pflanzenzüchtg.* **35**, 175.
- STAM, P. (1993): Construction of integrated linkage maps by means of a new computer package: JOINMAP. *Plant J.* **3**, 739-744.
- STEINMÜLLER, K. und K. APEL (1984): A simple and efficient procedure for isolating plant chromatin which is suitable for studies on DNaseI-sensitive domains and hypersensitive sites. *Plant Mol. Biol.* **7**, 87-94.
- SUITER, K.A., J.F. WENDEL und J.S. CASE (1983): Linkage-1: A PASCAL computer program for the detection and analysis of genetic linkage. *J. Heredity* **74**, 203-204.
- TANKSLEY, S.D., M.W. GANAL, J.P. PRINCE, M.C. DE VICENTE, M.W. BONIERBALE, P. BROUN, T.M. FULTON, J.J. GIOVANNONI, S. GRANDILLO, G.B. MARTIN, R. MESSEGUER, J.C. MILLER, L. MILLER, A.H. PATERSON, O. PINEDA, M.S. RÖDER, R.A. WING, W. WU und N.D. YOUNG (1992): High-density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics* **132**, 1141-1160.
- TARAMINO, G. und S. TINGEY (1996): Simple sequence repeats for germplasm analysis and mapping in maize. *Genome* **39**, 277-287.

TAUTZ, D. und M. RENZ (1983): An optimized freeze-squeeze method for the recovery of DNA fragments from agarose gels. *Anal. Biochem.* **132**, 14-19.

TAUTZ, D. und M. RENZ (1984): Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucl. Acids Res.* **12**, 4127-4138.

VAN ECK, H.J., J.N.A.M. ROUPPE VAN DER VOORT, J. DRAAISTRA, P. VAN ZANDVOORT, E. VAN ENCKEVORT, B. SEGERS, B. PELEMAN, E. JACOBSEN, J. HELDER und J. BAKKER (1995): The inheritance and chromosomal localization of AFLP markers in a non-inbred potato offspring. *Mol. Breeding* **1**, 397-410.

VOS, P., R. HOGERS, M. BLEEKER, M. REIJANS, T. VAN DE LEE, M. HORNES, A. FRIJTERS, J. POT, J. PELEMAN, M. KUIPER und M. ZABEAU (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res.* **23**, 4407-4414.

WAGNER, H. (1990): Genetische Untersuchungen und Kopplungsanalysen von Isoenzymen und morphologischen Markern bei *Beta vulgaris* L.. Dissertation, Universität Hannover.

WAGNER, H., W.E. WEBER und G. WRICKE (1992): Estimating linkage relationship of isozyme markers and morphological markers in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) including families with distorted segregations. *Plant Breeding* **108**, 89-96.

WANG, L.M., M.D. ATKINSON, C.N. CHINOY, K.M. DEVOS, R.L. HARCOURT, C.J. LIU, W.J. ROGERS und M.D. GALE (1991): RFLP-based genetic map of rye (*Secale cereale* L.) chromosome 1R. *Theor. Appl. Genet.* **82**, 174-178.

WANG, Z., J.L. WEBER, G. ZHONG und S.D. TANKSLEY (1994): Survey of plant short tandem DNA repeats. *Theor. Appl. Genet.* **88**, 1-6.

WANOUS, M.K. und J.P. GUSTAFSON (1995): A genetic map of rye chromosome 1R integrating RFLP and cytogenetic loci. *Theor. Appl. Genet.* **91**, 720-726.

WANOUS, M.K., P.G. GOICOCHEA und J.P. GUSTAFSON (1995): RFLP maps of rye chromosomes 6R and 7R including terminal C-bands. *Genome* **38**, 999-1004.

WAUGH, R., N. BONAR, E. BAIRD, B. THOMAS, A. GRANER, P. HAYES und W. POWELL (1997): Homology of AFLP products in three mapping populations of barley. *Mol. Gen. Genet.* **255**, 311-321.

WEBER, J.L. und P.E. MAY (1989): Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am. J. Hum. Genet.* **44**, 388-396.

WEBER, W.E. und G. WRICKE (1994): Genetic Markers in Plant Breeding. *Adv. Plant Breeding* **18**, 1-105. Paul Parey, Berlin.

- WEIMARK, A. (1975): Heterochromatin polymorphism in the rye karyotype as detected by the Giemsa C-banding technique. *Hereditas* **79**, 293-300.
- WEISING, K., F. WEIGAND, A.J. DRIESEL, G. KAHL, H. ZISCHLER und J.T. EPPLEN (1989): Polymorphic simple GATA/GACA repeats in plant genomes. *Nucl. Acids Res.* **17**, 10128.
- WILLIAMS, J.G.K., A.R. KUBELIK, K.J. LIVAK, J.A. RAFALSKI und S.V. TINGEY (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* **18**, 6531-6535.
- WRICKE, G. (1972): *Populationsgenetik*. Walter de Gruyter, Berlin, New York.
- WRICKE, G. (1978): Pseudo-Selbstkompatibilität beim Roggen und ihre Ausnutzung in der Züchtung. *Z. Pflanzenzüchtg.* **81**, 140-148.
- WRICKE, G. (1996): Use of genetic markers in plant breeding. *Votr. Pflanzenzüchtg.* **35**, 263-272.
- WRICKE, G. und P. WEHLING (1985): Linkage between an incompatibility locus and a peroxidase isozyme locus (Prx7) in rye. *Theor. Appl. Genet.* **71**, 289-291.
- WRICKE, G., P. WILDE, P. WEHLING UND C. GIESELMANN (1993): An isozyme marker for pollen fertility restoration in the Pampa cms system of rye (*Secale cereale* L.). *Plant Breeding* **111**, 290-294.
- WRICKE, G., P. DILL und P. SENFT (1996): Linkage between a major gene for mildew resistance and an RFLP marker on chromosome 1R of rye. *Plant Breeding* **115**, 71-73.
- WU, K.-S. und S.D. TANKSLEY (1993): Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. *Mol. Gen. Genet.* **241**, 225-235.
- ZABEAU, M. und P. VOS (1993): Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. European Patent Application, Publication number 0534858A1, Application number 92402629.7

7.Anhang

7.1 Zweipunkt-Kopplungsdaten neuer Marker der F₂-Kartierungspopulation

7.1.1 1R

Marker1	Marker2	χ^2	Freiheitsgrade	P	Rekombinationswert	Standardabweichung
Per7	<i>XTri25-11</i>	44,5635	4	0,0000	0,0963	0,0250
Per7	SCM39	40,4235	4	0,0000	0,0285	0,0163
Per7	E33M59-395	28,8712	2	0,0000	0,0932	0,0405
Per7	E37M48-222	28,6801	2	0,0000	0,1128	0,0416
Per7	E33M48-409	37,3364	2	0,0000	0,0608	0,0319
<i>Xiag95</i>	E37M48-91	12,0842	2	0,0020	0,1841	0,0617
<i>Xiag229b</i>	E37M48-91	45,2786	2	0,0000	0,0306	0,0233
<i>Xiag229b</i>	E33M59-395	6,5882	2	0,0370	0,2460	0,0701
OP-R2-470	<i>XTri25-11</i>	6,6570	2	0,0360	0,2517	0,0767
OP-R2-470	SCM39	6,8710	2	0,0320	0,2073	0,0805
OP-R2-470	E37M48-91	6,2568	1	0,0120	0,2517	0,1522
OP-R2-470	E33M59-395	10,7712	1	0,0010	0,1724	0,1678
OP-R2-470	E37M48-222	5,9753	1	0,0150	0,2546	0,1541
OP-R2-470	E33M48-409	5,2274	1	0,0220	0,2741	0,1590
<i>Xiag249</i>	<i>XTri25-11</i>	18,2933	4	0,0010	0,1252	0,0427
<i>Xiag249</i>	SCM39	21,5109	4	0,0000	0,0456	0,0259
<i>Xiag249</i>	E33M59-395	13,0320	2	0,0010	0,1177	0,0620
<i>Xiag249</i>	E37M48-222	13,2060	2	0,0010	0,1334	0,0629
<i>Xiag249</i>	E33M48-409	20,4396	2	0,0000	0,0587	0,0433
<i>Bm2</i>	<i>XTri25-11</i>	18,4040	4	0,0010	0,1328	0,0428
<i>Bm2</i>	SCM39	27,8530	4	0,0000	0,0283	0,0198
<i>Bm2</i>	E33M59-395	12,0250	2	0,0020	0,1398	0,0664
<i>Bm2</i>	E37M48-222	17,1875	2	0,0000	0,1028	0,0553
<i>Bm2</i>	E33M48-409	17,1394	2	0,0000	0,0907	0,0536
<i>Xpsr544</i>	<i>XTri25-11</i>	17,2287	4	0,0020	0,1647	0,0383
<i>Xpsr544</i>	SCM39	38,7494	4	0,0000	0,0118	0,0117
<i>Xpsr544</i>	E33M59-395	17,7450	2	0,0000	0,1241	0,0538
<i>Xpsr544</i>	E37M48-222	29,5024	2	0,0000	0,0718	0,0388
<i>Xpsr544</i>	E33M48-409	19,7937	2	0,0000	0,1092	0,0499
OP-Y11-1400H	<i>XTri25-11</i>	28,4714	2	0,0000	0,0629	0,0385
OP-Y11-1400H	SCM39	16,0899	2	0,0000	0,1036	0,0564
OP-Y11-1400H	E33M59-395	10,3010	1	0,0010	0,1760	0,1702
OP-Y11-1400H	E37M48-222	23,8129	1	0,0000	0,0823	0,1609
OP-Y11-1400H	E33M48-409	11,2148	1	0,0010	0,1721	0,1607
<i>XTri25-11</i>	SCM39	27,7943	4	0,0000	0,1036	0,0317
<i>XTri25-11</i>	E37M48-91	7,2377	2	0,0270	0,2805	0,0666
<i>XTri25-11</i>	E33M59-395	32,9351	2	0,0000	0,0702	0,0365
<i>XTri25-11</i>	E37M48-222	25,4052	2	0,0000	0,1317	0,0467
<i>XTri25-11</i>	E33M48-409	34,0615	2	0,0000	0,0735	0,0366
SCM39	E33M59-395	15,9526	2	0,0000	0,1299	0,0544
SCM39	E37M48-222	24,5700	2	0,0000	0,0928	0,0436
SCM39	E33M48-409	17,3558	2	0,0000	0,1119	0,0494
E37M48-91	E33M59-395	8,7442	1	0,0030	0,2570	0,1245
E37M48-91	E33M48-409	4,3172	1	0,0380	0,3106	0,1160
E33M59-395	E37M48-222	23,1870	1	0,0000	0,1393	0,1329
E33M59-395	E33M48-409	32,6512	1	0,0000	0,0853	0,1374
E37M48-222	E33M48-409	27,5461	1	0,0000	0,1179	0,1291

7.1.2 2R

Marker1	Marker2	χ^2	Freiheitsgrade	P	Rekombinationswert	Standardabweichung
ßGlu	E36M61-292	39,9674	2	0,0000	0,0809	0,0353
ßGlu	E36M59-116	44,5435	2	0,0000	0,0374	0,0260
ßGlu	E37M48-302	50,4181	2	0,0000	0,0462	0,0265
ßGlu	E37M48-342	44,4208	2	0,0000	0,0631	0,0314
ßGlu	E33M59-294	48,9857	2	0,0000	0,0187	0,0186
ßGlu	E33M61-122	42,5834	2	0,0000	0,0534	0,0302
ßGlu	E33M48-164	30,0000	2	0,0000	0,1184	0,0440
<i>Xiag267a</i>	E33M48-259	6,7730	2	0,0340	0,3002	0,0730
<i>Xiag267a</i>	E37M48-145	7,3812	2	0,0250	0,3508	0,0756
<i>Xiag267a</i>	E33M60-137	6,4050	2	0,0410	0,3086	0,0768
<i>Xiag267a</i>	E36M61-292	11,6239	2	0,0030	0,2836	0,0693
<i>Xiag267a</i>	E36M61-292	40,7770	2	0,0000	0,0526	0,0308
<i>Xiag267a</i>	E36M59-116	9,6318	2	0,0080	0,2414	0,0702
<i>Xiag267a</i>	E37M48-302	7,8546	2	0,0200	0,2776	0,0686
<i>Xiag267a</i>	E37M48-342	18,4007	2	0,0000	0,2046	0,0606
<i>Xiag267a</i>	E33M61-122	7,8464	2	0,0200	0,2659	0,0712
<i>Xiag267a</i>	E33M48-164	15,4209	2	0,0000	0,1988	0,0615
<i>Xiag240d</i>	E36M59-116	17,4587	1	0,0000	0,0736	0,1948
<i>Xiag240d</i>	E37M48-302	12,4850	1	0,0000	0,1804	0,1648
<i>Xiag240d</i>	E33M59-294	15,0000	1	0,0000	0,1396	0,1782
<i>Xiag240d</i>	E33M61-122	14,4034	1	0,0000	0,1322	0,1787
<i>Xiag61b</i>	E36M61-292	4,2955	1	0,0380	0,0000	--
<i>Xiag61b</i>	E36M59-116	31,4260	1	0,0000	0,0688	0,1450
<i>Xiag61b</i>	E37M48-302	26,8346	1	0,0000	0,1223	0,1324
<i>Xiag61b</i>	E37M48-342	4,2793	1	0,0390	0,0000	--
<i>Xiag61b</i>	E33M59-294	26,9182	1	0,0000	0,0983	0,1441
<i>Xiag61b</i>	E33M61-122	27,9546	1	0,0000	0,0919	0,1414
<i>Xiag61b</i>	E33M48-164	4,4123	1	0,0360	0,0000	--
<i>Xiag69c</i>	E36M61-292	34,0525	2	0,0000	0,0780	0,0381
<i>Xiag69c</i>	E37M48-302	34,6102	2	0,0000	0,0770	0,0375
<i>Xiag69c</i>	E37M48-342	34,5105	2	0,0000	0,0749	0,0377
<i>Xiag69c</i>	E33M59-294	33,4400	2	0,0000	0,0482	0,0329
<i>Xiag69c</i>	E33M61-122	37,8947	2	0,0000	0,0436	0,0300
<i>Xiag69c</i>	E33M48-164	25,3401	2	0,0000	0,1188	0,0487
<i>Xiag229d</i>	E36M61-292	32,3389	1	0,0000	0,0934	0,1334
<i>Xiag229d</i>	E37M48-302	6,8293	1	0,0090	0,0000	--
<i>Xiag229d</i>	E37M48-342	44,8875	1	0,0000	0,0363	0,1359
<i>Xiag229d</i>	E33M59-294	5,6952	1	0,0170	0,0000	--
<i>Xiag229d</i>	E33M61-122	5,5477	1	0,0190	0,0000	--
<i>Xiag229d</i>	E33M48-164	25,3219	1	0,0000	0,1206	0,1375
<i>Xiag240b</i>	E33M48-259	7,4921	2	0,0240	0,5000	0,0884
<i>Xiag240b</i>	E36M61-292	13,4169	2	0,0010	0,1896	0,0619
<i>Xiag240b</i>	E37M48-302	22,0583	2	0,0000	0,1332	0,0516
<i>Xiag240b</i>	E37M48-342	23,9368	2	0,0000	0,1165	0,0483
<i>Xiag240b</i>	E33M59-294	20,8744	2	0,0000	0,1097	0,0512
<i>Xiag240b</i>	E33M61-122	23,9852	2	0,0000	0,0977	0,0467
<i>Xiag240b</i>	E33M48-164	14,6164	2	0,0010	0,1738	0,0606
OP-O15-1300E	E36M61-292	9,7078	1	0,0020	0,2185	0,1456

Marker1	Marker2	χ^2	Freiheitsgrade	P	Rekombinationswert	Standardabweichung
OP-O15-1300E	E37M48-342	10,8102	1	0,0010	0,2082	0,1463
OP-O15-1300E	E33M59-294	5,8539	1	0,0160	0,0000	--
OP-O15-1300E	E33M61-122	6,5025	1	0,0110	0,0000	--
OP-O15-1300E	E33M48-164	20,8421	1	0,0000	0,1073	0,1579
OP-R2-1800	E36M61-292	4,0740	1	0,0440	0,2821	0,1558
OP-R2-1800	E33M61-122	3,9669	1	0,0460	0,0000	--
OP-R2-1800	E33M48-164	10,4724	1	0,0010	0,1902	0,1641
<i>Xpsr666</i>	E37M48-277	9,2234	2	0,0100	0,2548	0,0678
<i>Xpsr666</i>	E33M48-259	17,7815	2	0,0000	0,1666	0,0559
<i>Xpsr666</i>	E36M59-232	8,0709	2	0,0180	0,2488	0,0736
<i>Xiag240a</i>	SCM43	9,5759	2	0,0080	0,2205	0,0759
<i>Xiag240a</i>	E37M48-277	9,1538	1	0,0020	0,2014	0,1632
<i>Xiag240a</i>	E36M59-347	4,7953	1	0,0290	0,2496	0,1784
<i>Xiag240a</i>	E33M48-259	8,4158	1	0,0040	0,2054	0,1653
<i>Xiag61a</i>	SCM43	6,9147	2	0,0320	0,3015	0,0812
<i>Xiag61a</i>	E37M48-277	27,5713	1	0,0000	0,1163	0,1338
<i>Xiag61a</i>	E36M59-347	11,3612	1	0,0010	0,2139	0,1365
<i>Xiag61a</i>	E33M48-259	6,6681	1	0,0100	0,2831	0,1247
<i>Xiag61a</i>	E36M59-232	4,5558	1	0,0330	0,3042	0,1334
<i>Xiag61a</i>	E36M59-116	4,1270	1	0,0420	0,3157	0,1231
<i>Xiag57</i>	E37M48-277	15,8680	2	0,0000	0,2009	0,0606
<i>Xiag57</i>	E36M59-347	35,7483	2	0,0000	0,0698	0,0383
<i>Xpsr107</i>	SCM69	56,0000	4	0,0000	0,0000	--
<i>Xpsr107</i>	SCM43	47,8781	4	0,0000	0,0609	0,0300
<i>Xpsr107</i>	OP-O6-1100	37,7038	2	0,0000	0,0400	0,0294
<i>Xpsr107</i>	E33M48-259	8,2671	2	0,0160	0,2668	0,0752
<i>Xpsr107</i>	E36M59-232	21,7582	2	0,0000	0,1060	0,0538
<i>Xpsr107</i>	E37M48-145	30,0001	2	0,0000	0,0804	0,0415
<i>Xpsr107</i>	E33M60-137	34,4446	2	0,0000	0,0420	0,0311
<i>Xpsr107</i>	E36M61-292	33,7136	2	0,0000	0,0591	0,0356
<i>Xpsr107</i>	E33M60-99	20,1616	2	0,0000	0,1537	0,0577
<i>Xpsr107</i>	E33M60-344	20,1616	2	0,0000	0,1537	0,0577
<i>Xpsr107</i>	E37M49-130	32,2903	2	0,0000	0,0634	0,0377
<i>Xpsr107</i>	E37M49-151	36,8347	2	0,0000	0,0407	0,0299
<i>Xpsr102</i>	SCM69	41,0825	4	0,0000	0,0469	0,0267
<i>Xpsr102</i>	SCM43	53,2512	4	0,0000	0,0729	0,0292
<i>Xpsr102</i>	OP-O6-1100	37,7198	2	0,0000	0,0551	0,0330
<i>Xpsr102</i>	E36M59-232	21,1364	2	0,0000	0,1306	0,0533
<i>Xpsr102</i>	E37M48-145	27,6303	2	0,0000	0,1204	0,0463
<i>Xpsr102</i>	E33M60-137	30,8887	2	0,0000	0,0921	0,0426
<i>Xpsr102</i>	E36M61-292	31,5748	2	0,0000	0,1012	0,0425
<i>Xpsr102</i>	E33M60-99	22,8095	2	0,0000	0,1500	0,0526
<i>Xpsr102</i>	E33M60-344	22,8095	2	0,0000	0,1500	0,0526
<i>Xpsr102</i>	E37M49-130	28,9076	2	0,0000	0,1075	0,0446
<i>Xpsr102</i>	E37M49-151	33,5841	2	0,0000	0,0866	0,0397
OP-O20-300	OP-O6-1100	7,2138	1	0,0070	0,2635	0,1300
OP-O20-300	E33M48-259	4,2105	1	0,0400	0,3088	0,1288
OP-O20-300	E36M59-232	13,5642	1	0,0000	0,1534	0,1555

Marker1	Marker2	χ^2	Freiheitsgrade	P	Rekombinationswert	Standardabweichung
OP-O20-300	E37M48-145	10,3827	1	0,0010	0,2302	0,1326
OP-O20-300	E33M60-137	7,8155	1	0,0050	0,2578	0,1375
OP-O20-300	E36M61-292	8,8837	1	0,0030	0,2517	0,1310
OP-O20-300	E33M60-99	4,3552	1	0,0370	0,0000	--
OP-O20-300	E33M60-344	4,3552	1	0,0370	0,0000	--
OP-O20-300	E37M48-342	4,4215	1	0,0350	0,3047	0,1278
OP-O20-300	E33M48-164	7,9374	1	0,0050	0,2508	0,1352
OP-O20-300	E37M49-130	15,8519	1	0,0000	0,1680	0,1394
OP-O20-300	E37M49-151	14,0721	1	0,0000	0,1886	0,1368
OP-A5-530	SCM69	12,8697	2	0,0020	0,1111	0,0647
OP-A5-530	SCM43	16,9071	2	0,0000	0,1170	0,0564
OP-A5-530	OP-O6-1100	18,4326	1	0,0000	0,1312	0,1548
OP-A5-530	E36M59-232	9,1106	1	0,0030	0,1651	0,1737
OP-A5-530	E37M48-145	5,7143	1	0,0170	0,2368	0,1477
OP-A5-530	E33M60-137	12,1731	1	0,0000	0,1624	0,1613
OP-A5-530	E36M61-292	22,9004	1	0,0000	0,0865	0,1566
OP-A5-530	E37M49-130	12,0372	1	0,0010	0,1652	0,1569
OP-A5-530	E37M49-151	12,4474	1	0,0000	0,1620	0,1550
<i>Xiag235</i>	SCM69	34,5385	4	0,0000	0,0964	0,0384
<i>Xiag235</i>	SCM43	34,4167	4	0,0000	0,1288	0,0395
<i>Xiag235</i>	OP-O6-1100	29,1061	2	0,0000	0,1104	0,0456
<i>Xiag235</i>	E33M48-259	7,8228	2	0,0200	0,2911	0,0727
<i>Xiag235</i>	E36M59-232	15,7792	2	0,0000	0,1800	0,0624
<i>Xiag235</i>	E37M48-145	18,3294	2	0,0000	0,1801	0,0569
<i>Xiag235</i>	E33M60-137	18,7353	2	0,0000	0,1697	0,0581
<i>Xiag235</i>	E36M61-292	19,9800	2	0,0000	0,1735	0,0559
<i>Xiag235</i>	E33M60-99	27,1434	2	0,0000	0,1288	0,0492
<i>Xiag235</i>	E33M60-344	27,1434	2	0,0000	0,1288	0,0492
<i>Xiag235</i>	E37M49-130	22,4046	2	0,0000	0,1475	0,0526
<i>Xiag235</i>	E37M49-151	26,5126	2	0,0000	0,1249	0,0480
<i>Xiag33</i>	SCM69	58,2250	4	0,0000	0,0149	0,0148
<i>Xiag33</i>	SCM43	59,3556	4	0,0000	0,0601	0,0265
<i>Xiag33</i>	OP-O6-1100	44,3198	2	0,0000	0,0369	0,0263
<i>Xiag33</i>	E33M48-259	9,0618	2	0,0110	0,2892	0,0718
<i>Xiag33</i>	E36M59-232	22,6090	2	0,0000	0,1314	0,0535
<i>Xiag33</i>	E37M48-145	34,7424	2	0,0000	0,0864	0,0393
<i>Xiag33</i>	E33M60-137	37,7584	2	0,0000	0,0559	0,0332
<i>Xiag33</i>	E36M61-292	38,6311	2	0,0000	0,0680	0,0349
<i>Xiag33</i>	E33M60-99	33,2267	2	0,0000	0,1069	0,0445
<i>Xiag33</i>	E33M60-344	33,2267	2	0,0000	0,1069	0,0445
<i>Xiag33</i>	E37M49-130	36,6187	2	0,0000	0,0723	0,0367
<i>Xiag33</i>	E37M49-151	41,3331	2	0,0000	0,0525	0,0310
<i>Xiag68</i>	SCM69	52,9766	4	0,0000	0,0427	0,0244
<i>Xiag68</i>	SCM43	52,5382	4	0,0000	0,0748	0,0299
<i>Xiag68</i>	OP-O6-1100	35,8001	2	0,0000	0,0737	0,0374
<i>Xiag68</i>	E33M48-259	8,9663	2	0,0110	0,2644	0,0703
<i>Xiag68</i>	E36M59-232	20,6323	2	0,0000	0,1360	0,0550
<i>Xiag68</i>	E37M48-145	27,1232	2	0,0000	0,1232	0,0473

Marker1	Marker2	χ^2	Freiheitsgrade	P	Rekombi- nationswert	Standard- abweichung
<i>Xiag68</i>	E33M60-99	24,6652	2	0,0000	0,1416	0,0521
<i>Xiag68</i>	E33M60-137	32,5923	2	0,0000	0,0754	0,0393
<i>Xiag68</i>	E37M49-130	28,3109	2	0,0000	0,1104	0,0456
<i>Xiag68</i>	E37M49-151	32,9193	2	0,0000	0,0890	0,0406
<i>Xiag167</i>	SCM69	37,3763	4	0,0000	0,1134	0,0389
<i>Xiag167</i>	SCM43	27,9169	4	0,0000	0,1711	0,0453
<i>Xiag167</i>	OP-O6-1100	22,7322	2	0,0000	0,1609	0,0529
<i>Xiag167</i>	E33M48-259	10,0715	2	0,0070	0,2465	0,0668
<i>Xiag167</i>	E36M59-232	13,4978	2	0,0010	0,1890	0,0639
<i>Xiag167</i>	E37M48-145	25,4870	2	0,0000	0,1416	0,0497
<i>Xiag167</i>	E33M60-137	17,9800	2	0,0000	0,1777	0,0594
<i>Xiag167</i>	E36M61-292	19,9666	2	0,0000	0,1778	0,0556
<i>Xiag167</i>	E33M60-99	20,5005	2	0,0000	0,1444	0,0516
<i>Xiag167</i>	E33M60-344	20,5005	2	0,0000	0,1444	0,0516
<i>Xiag167</i>	E33M59-294	64,8795	2	0,0390	0,2756	0,0755
<i>Xiag167</i>	E37M49-130	16,9349	2	0,0000	0,1896	0,0584
<i>Xiag167</i>	E37M49-151	20,9592	2	0,0000	0,1648	0,0540
<i>Xiag233</i>	SCM69	40,0405	4	0,0000	0,0772	0,0338
<i>Xiag233</i>	SCM43	31,9546	4	0,0000	0,1333	0,0407
<i>Xiag233</i>	OP-O6-1100	29,6269	2	0,0000	0,1120	0,0460
<i>Xiag233</i>	E33M48-259	75,2912	2	0,0230	0,2934	0,0737
<i>Xiag233</i>	E36M59-232	95,6794	2	0,0080	0,2329	0,0722
<i>Xiag233</i>	E37M48-145	18,3112	2	0,0000	0,1822	0,0578
<i>Xiag233</i>	E33M60-137	16,2337	2	0,0000	0,1953	0,0628
<i>Xiag233</i>	E36M61-292	22,0461	2	0,0000	0,1605	0,0543
<i>Xiag233</i>	E33M60-99	25,1939	2	0,0000	0,1304	0,0500
<i>Xiag233</i>	E33M60-344	25,1939	2	0,0000	0,1304	0,0500
<i>Xiag233</i>	E37M49-130	14,3788	2	0,0010	0,2101	0,0631
<i>Xiag233</i>	E37M49-151	17,9483	2	0,0000	0,1845	0,0587
OP-M20-850E	SCM69	98,0903	2	0,0070	0,0976	0,0619
OP-M20-850E	SCM43	13,6284	2	0,0010	0,0874	0,0564
OP-M20-850E	E33M60-99	13,9425	1	0,0000	0,1387	0,1700
OP-M20-850E	E33M60-344	13,9425	1	0,0000	0,1387	0,1700
SCM69	SCM43	51,3158	4	0,0000	0,0168	0,0167
SCM69	OP-O6-1100	32,8211	2	0,0000	0,0221	0,0244
SCM69	E36M59-232	14,4886	2	0,0010	0,1257	0,0641
SCM69	E37M48-145	23,8091	2	0,0000	0,0724	0,0445
SCM69	E33M60-137	23,4150	2	0,0000	0,0540	0,0409
SCM69	E36M61-292	19,8054	2	0,0000	0,0997	0,0522
SCM69	E33M60-99	9,3131	2	0,0090	0,1673	0,0703
SCM69	E33M60-344	13,2202	2	0,0010	0,1522	0,0661
SCM69	E37M49-130	18,6186	2	0,0000	0,1071	0,0548
SCM69	E37M49-151	23,1080	2	0,0000	0,0756	0,0455
SCM43	OP-O6-1100	35,2351	2	0,0000	0,0247	0,0248
SCM43	E36M59-232	22,9407	2	0,0000	0,0849	0,0469
SCM43	E37M48-145	23,3481	2	0,0000	0,1132	0,0486
SCM43	E33M60-137	27,0578	2	0,0000	0,0916	0,0447
SCM43	E36M61-292	28,3813	2	0,0000	0,0881	0,0429

Marker1	Marker2	χ^2	Freiheitsgrade	P	Rekombi- nationswert	Standard- abweichung
SCM43	E33M60-344	32,3126	2	0,0000	0,0835	0,0423
SCM43	E37M49-130	21,0062	2	0,0000	0,1208	0,0507
SCM43	E37M49-151	26,4623	2	0,0000	0,0918	0,0438
OP-O6-1100	E36M59-232	17,8065	1	0,0000	0,1579	0,1462
OP-O6-1100	E37M48-145	26,1082	1	0,0000	0,1272	0,1334
OP-O6-1100	E33M60-137	34,4927	1	0,0000	0,0590	0,1452
OP-O6-1100	E36M61-292	29,7664	1	0,0000	0,1067	0,1342
OP-O6-1100	E33M60-99	5,9566	1	0,0150	0,2222	0,1318
OP-O6-1100	E33M60-344	5,9566	1	0,0150	0,2222	0,1318
OP-O6-1100	E37M49-130	28,6173	1	0,0000	0,1109	0,1353
OP-O6-1100	E37M49-151	32,3146	1	0,0000	0,0905	0,1360
E37M48-277	E36M59-347	29,7041	1	0,0000	0,1016	0,1356
E37M48-277	E33M48-259	4,8313	1	0,0280	0,3123	0,1149
E37M48-277	E36M61-292	5,6715	1	0,0170	0,3150	0,1128
E33M48-259	E36M59-232	5,8518	1	0,0160	0,2856	0,1282
E33M48-259	E37M48-145	15,7759	1	0,0000	0,2136	0,1201
E33M48-259	E33M60-137	12,4950	1	0,0000	0,2326	0,1240
E33M48-259	E36M61-292	15,7759	1	0,0000	0,2136	0,1201
E33M48-259	E33M60-344	3,8828	1	0,0490	0,2507	0,1186
E33M48-259	E37M49-130	8,6731	1	0,0030	0,2697	0,1182
E33M48-259	E37M49-151	11,9874	1	0,0010	0,2404	0,1194
E36M59-232	E37M48-145	26,9191	1	0,0000	0,1177	0,1350
E36M59-232	E33M60-137	29,8781	1	0,0000	0,0867	0,1461
E36M59-232	E36M61-292	28,6825	1	0,0000	0,1142	0,1352
E36M59-232	E33M60-99	7,0778	1	0,0080	0,0000	--
E36M59-232	E33M60-344	7,5290	1	0,0060	0,0000	--
E36M59-232	E33M48-164	4,6890	1	0,0300	0,3109	0,1273
E36M59-232	E36M59-116	5,7112	1	0,0170	0,2892	0,1292
E36M59-232	E37M49-130	34,0108	1	0,0000	0,0778	0,1376
E36M59-232	E37M49-151	39,8328	1	0,0000	0,0563	0,1368
E37M48-145	E33M60-137	40,6043	1	0,0000	0,0671	0,1306
E37M48-145	E36M61-292	42,8294	1	0,0000	0,0761	0,1231
E37M48-145	E33M60-99	9,0791	1	0,0030	0,0000	--
E37M48-145	E33M60-344	9,5818	1	0,0020	0,0000	--
E37M48-145	E37M49-130	40,6116	1	0,0000	0,0794	0,1250
E37M48-145	E37M49-151	45,7420	1	0,0000	0,0617	0,1244
E33M60-137	E36M61-292	44,7140	1	0,0000	0,0494	0,1309
E33M60-137	E33M60-99	10,2664	1	0,0010	0,0000	--
E33M60-137	E33M60-344	10,8220	1	0,0010	0,0000	--
E33M60-137	E37M49-130	43,2520	1	0,0000	0,0517	0,1332
E33M60-137	E37M49-151	48,1951	1	0,0000	0,0334	0,1323
E36M61-292	E33M60-99	9,8116	1	0,0020	0,0000	--
E36M61-292	E33M60-344	10,3494	1	0,0010	0,0000	--
E36M61-292	E37M49-130	45,2177	1	0,0000	0,0623	0,1254
E36M61-292	E37M49-151	50,3108	1	0,0000	0,0454	0,1247
E33M60-99	E33M60-344	61,0000	1	0,0000	0,0000	--
E33M60-99	E37M49-130	8,8859	1	0,0030	0,0000	--
E33M60-99	E37M49-151	9,3507	1	0,0020	0,0000	--

Marker1	Marker2	χ^2	Freiheitsgrade	P	Rekombinationswert	Standardabweichung
E33M60-344	E37M49-151	9,8658	1	0,0020	0,0000	--
E36M61-292	E37M48-302	3,9757	1	0,0460	0,2500	0,1159
E36M61-292	E37M48-342	25,7268	1	0,0000	0,1421	0,1249
E36M61-292	E33M48-164	18,2341	1	0,0000	0,1855	0,1248
E36M59-116	E37M48-302	49,8554	1	0,0000	0,0185	0,1348
E36M59-116	E37M48-342	6,3860	1	0,0120	0,0000	--
E36M59-116	E33M59-294	46,0000	1	0,0000	0,0000	--
E36M59-116	E33M61-122	43,7347	1	0,0000	0,0211	0,1428
E36M59-116	E33M48-164	6,6017	1	0,0100	0,0000	--
E37M48-302	E37M48-342	8,1469	1	0,0040	0,0000	--
E37M48-302	E33M59-294	49,1400	1	0,0000	0,0182	0,1360
E37M48-302	E33M61-122	48,0326	1	0,0000	0,0355	0,1311
E37M48-302	E33M48-164	8,6258	1	0,0030	0,0000	--
E37M48-342	E33M59-294	6,8297	1	0,0090	0,0000	--
E37M48-342	E33M61-122	5,6434	1	0,0180	0,0000	--
E37M48-342	E33M48-164	33,2406	1	0,0000	0,1028	0,1274
E33M59-294	E33M61-122	42,8108	1	0,0000	0,0214	0,1443
E33M59-294	E33M48-164	7,0582	1	0,0080	0,0000	--
E33M61-122	E33M48-164	5,9927	1	0,0140	0,0000	--
E37M49-130	E37M49-151	58,2065	1	0,0000	0,0154	0,1260

7.1.3 3R

Marker1	Marker2	χ^2	Freiheitsgrade	P	Rekombinationswert	Standardabweichung
Got4	<i>Xiag311</i>	102,9371	4	0,0000	0,0709	0,0221
Got4	SCM5	83,2308	4	0,0000	0,0599	0,0224
Got4	E33M59-128	35,5417	2	0,0000	0,1133	0,0438
Got4	E37M48-197	39,7390	2	0,0000	0,0943	0,0384
Got4	E36M61-147	7,1218	2	0,0280	0,3150	0,0673
<i>Xiag241b</i>	<i>Xiag311</i>	32,3954	2	0,0000	0,1251	0,0452
<i>Xiag241b</i>	SCM5	42,3599	2	0,0000	0,0359	0,0267
<i>Xiag241b</i>	E33M59-128	6,7587	1	0,0090	0,2152	0,1364
<i>Xiag241b</i>	E36M61-147	6,6898	1	0,0100	0,2956	0,1237
<i>Xiag241b</i>	E36M61-250	4,6611	1	0,0310	0,3247	0,1223
<i>Xpsr578</i>	<i>Xiag311</i>	25,7734	4	0,0000	0,1744	0,0515
<i>Xpsr578</i>	SCM5	37,6543	4	0,0000	0,0425	0,0298
<i>Xpsr578</i>	E33M59-128	12,1359	2	0,0020	0,1891	0,0770
<i>Xpsr578</i>	E37M48-197	12,3684	2	0,0020	0,1808	0,0753
<i>Xpsr578</i>	E36M61-147	7,7757	2	0,0200	0,2461	0,0846
<i>Xpsr578</i>	E36M61-250	6,2646	2	0,0440	0,2650	0,0889
<i>Xpsr902</i>	<i>Xiag311</i>	55,5737	4	0,0000	0,1402	0,0343
<i>Xpsr902</i>	SCM5	59,4730	4	0,0000	0,0901	0,0296
<i>Xpsr902</i>	E33M59-128	24,1632	2	0,0000	0,1449	0,0532
<i>Xpsr902</i>	E37M48-197	26,3416	2	0,0000	0,1306	0,0491
OP-B12-400H	<i>Xiag311</i>	16,6406	2	0,0000	0,1265	0,0595
OP-B12-400H	SCM5	18,1867	2	0,0000	0,1086	0,0586
OP-B12-400H	E33M59-128	10,2959	1	0,0010	0,1615	0,1798
OP-B12-400H	E37M48-197	3,8949	1	0,0480	0,2243	0,1689
OP-O7-950	<i>Xiag311</i>	44,3526	2	0,0000	0,0509	0,0295
OP-O7-950	SCM5	38,7932	2	0,0000	0,0439	0,0301
OP-O7-950	E33M59-128	7,7378	1	0,0050	0,0002	0,1508
OP-O7-950	E37M48-197	4,1143	1	0,0430	0,0002	0,1443
OP-O7-950	E36M61-147	5,8212	1	0,0160	0,2928	0,1276
OP-O10-1100	<i>Xiag311</i>	28,1509	2	0,0000	0,1568	0,0489
OP-O10-1100	SCM5	30,5373	2	0,0000	0,1090	0,0441
OP-O10-1100	E33M59-128	4,7702	1	0,0290	0,2365	0,1321
OP-O10-1100	E36M61-147	6,1555	1	0,0130	0,2987	0,1201
OP-O10-1100	E36M61-250	3,8440	1	0,0500	0,3296	0,1185
<i>Xpsr689</i>	<i>Xiag311</i>	36,9029	4	0,0000	0,1683	0,0409
<i>Xpsr689</i>	SCM5	27,4149	4	0,0000	0,1875	0,0456
<i>Xpsr689</i>	E33M59-128	15,3559	2	0,0000	0,1795	0,0669
<i>Xpsr689</i>	E37M48-197	15,6968	2	0,0000	0,1322	0,0548
<i>Xpsr689</i>	E36M61-147	10,0000	2	0,0070	0,2689	0,0755
<i>Xpsr689</i>	E36M61-250	8,7615	2	0,0130	0,2817	0,0771
<i>Xmwig932</i>	E36M61-147	16,8000	2	0,0000	0,1811	0,0599
<i>Xmwig932</i>	E36M61-250	14,3199	2	0,0010	0,1970	0,0631
<i>Xmwig932</i>	E33M60-123	33,0449	2	0,0000	0,0674	0,0380
<i>Xiag120</i>	<i>Xiag311</i>	28,5044	4	0,0000	0,2198	0,0436
<i>Xiag120</i>	SCM5	35,2901	4	0,0000	0,1723	0,0410
<i>Xiag120</i>	E36M61-147	15,5716	2	0,0000	0,1947	0,0586
<i>Xiag120</i>	E36M61-250	12,9837	2	0,0020	0,2107	0,0614

Marker1	Marker2	χ^2	Freiheitsgrade	P	Rekombi- nationswert	Standard- abweichung
<i>Xiag180</i>	SCM5	38,5185	4	0,0000	0,1490	0,0391
<i>Xiag180</i>	E37M48-197	98,9793	2	0,0070	0,2724	0,0699
<i>Xiag180</i>	E36M61-147	20,0372	2	0,0000	0,1656	0,0547
<i>Xiag180</i>	E36M61-250	17,3737	2	0,0000	0,1792	0,0573
<i>Xiag311</i>	SCM5	44,8656	4	0,0000	0,1400	0,0367
<i>Xiag311</i>	E33M59-128	30,9801	2	0,0000	0,1182	0,0467
<i>Xiag311</i>	E37M48-197	46,1338	2	0,0000	0,0406	0,0266
<i>Xiag311</i>	E36M61-147	6,9728	2	0,0310	0,3106	0,0702
<i>Xiag311</i>	E36M61-250	6,8976	2	0,0320	0,3126	0,0710
SCM5	E33M59-128	11,5941	2	0,0030	0,2357	0,0735
E33M59-128	E37M48-197	27,0974	1	0,0000	0,1184	0,1325
E36M61-147	E36M61-250	63,0000	1	0,0000	0,0000	--
E36M61-147	E33M60-123	21,0277	1	0,0000	0,1760	0,1233
E36M61-250	E33M60-123	20,9261	1	0,0000	0,1676	0,1258

7.1.4 4R

Marker1	Marker2	χ^2	Freiheitsgrade	P	Rekombinationswert	Standardabweichung
<i>Xiag229e</i>	E36M61-290	46,8000	1	0,0000	0,0197	0,1386
<i>Xiag229e</i>	E33M48-205	5,6559	1	0,0170	0,0000	--
<i>Xiag229e</i>	E36M59-120	7,8675	1	0,0050	0,2612	0,1343
<i>Xiag229e</i>	E33M61-90	6,2577	1	0,0120	0,0000	--
<i>Xpsr584</i>	SCM5a-650	29,7354	2	0,0000	0,0280	0,0286
<i>Xpsr584</i>	E33M48-205	21,3935	2	0,0000	0,1496	0,0583
<i>Xpsr584</i>	E36M59-120	14,4288	2	0,0010	0,1640	0,0649
<i>Xpsr584</i>	E33M61-90	25,7630	2	0,0000	0,0975	0,0502
<i>Xpsr103</i>	SCM5a-650	48,4071	2	0,0000	0,0191	0,0188
<i>Xpsr103</i>	E33M48-205	25,4291	2	0,0000	0,1114	0,0467
<i>Xpsr103</i>	E36M59-120	29,4330	2	0,0000	0,0851	0,0427
<i>Xpsr103</i>	E33M61-90	36,7388	2	0,0000	0,0420	0,0301
<i>Xiag32</i>	SCM5a-650	45,5038	2	0,0000	0,0372	0,0257
<i>Xiag32</i>	E33M48-205	38,5489	2	0,0000	0,0587	0,0325
<i>Xiag32</i>	E36M59-120	31,5723	2	0,0000	0,0807	0,0403
<i>Xiag32</i>	E33M61-90	38,6738	2	0,0000	0,0559	0,0329
<i>Xiag115</i>	SCM5a-650	46,8571	2	0,0000	0,0191	0,0191
<i>Xiag115</i>	E33M48-205	27,3421	2	0,0000	0,1063	0,0452
<i>Xiag115</i>	E36M59-120	25,7218	2	0,0000	0,1083	0,0476
<i>Xiag115</i>	E33M61-90	35,2151	2	0,0000	0,0595	0,0350
<i>Xiag73</i>	SCM5a-650	34,8342	2	0,0000	0,0606	0,0346
<i>Xiag73</i>	E33M48-205	26,0516	2	0,0000	0,1087	0,0467
<i>Xiag73</i>	E36M59-120	21,1036	2	0,0000	0,1343	0,0540
<i>Xiag73</i>	E33M61-90	30,7465	2	0,0000	0,0803	0,0410
OP-O2-1100H	E36M61-290	4,4112	1	0,0360	0,3281	0,1427
OP-O2-1100H	E33M48-205	8,4052	1	0,0040	0,0000	--
OP-O2-1100H	E36M59-120	9,7065	1	0,0020	0,2137	0,1555
OP-O20-400	SCM5a-650	6,5882	1	0,0100	0,0000	--
OP-O20-400	E36M61-290	4,4489	1	0,0350	0,3146	0,1282
OP-O20-400	E33M48-205	6,3158	1	0,0120	0,0000	--
OP-O20-400	E36M59-120	20,0534	1	0,0000	0,1240	0,1532
OP-O20-400	E33M61-90	9,1779	1	0,0020	0,0000	--
SCM5a-650	E33M48-205	22,2727	1	0,0000	0,1215	0,1464
SCM5a-650	E36M59-120	5,0575	1	0,0250	0,0000	--
SCM5a-650	E33M61-90	34,9166	1	0,0000	0,0437	0,1504
E36M61-290	E36M59-120	4,8440	1	0,0280	0,2968	0,1260
E33M48-205	E33M61-90	34,7756	1	0,0000	0,0769	0,1364
E36M59-120	E33M61-90	7,3412	1	0,0070	0,0000	--

7.1.5 5R

Marker1	Marker2	χ^2	Freiheitsgrade	P	Rekombinationswert	Standardabweichung
Est5	SCM138	16,8783	4	0,0020	0,2343	0,0526
Est5	E33M60-259	26,6222	2	0,0000	0,1393	0,0472
Est5	E36M61-263	24,1210	2	0,0000	0,1893	0,0540
Est5	E37M48-84	21,5810	2	0,0000	0,2119	0,0562
Est5	E36M61-346	22,3037	2	0,0000	0,2031	0,0559
Est5	E36M59-83	25,3667	2	0,0000	0,1263	0,0474
Est5	E33M48-119	14,7606	2	0,0010	0,2471	0,0618
Est5	E37M48-248	27,5598	2	0,0000	0,1387	0,0460
Est5	E36M59-150	21,3241	2	0,0000	0,1688	0,0547
Est5	E37M48-213	18,5034	2	0,0000	0,2328	0,0592
Est5	E36M61-146	19,5161	2	0,0000	0,2340	0,0584
Est5	E36M61-150	15,5444	2	0,0000	0,2256	0,0583
Chl	SCM138	18,5162	2	0,0000	0,1480	0,0567
Chl	E33M60-259	38,9552	1	0,0000	0,0830	0,1269
Chl	E36M61-263	7,9260	1	0,0050	0,0000	--
Chl	E37M48-84	8,7666	1	0,0030	0,0000	--
Chl	E36M61-346	8,5787	1	0,0030	0,0000	--
Chl	E36M59-83	31,4007	1	0,0000	0,0962	0,1333
Chl	E33M48-119	8,1469	1	0,0040	0,0000	--
Chl	E37M48-248	39,7352	1	0,0000	0,0824	0,1239
Chl	E36M59-150	6,9841	1	0,0080	0,0000	--
Chl	E37M48-213	9,0074	1	0,0030	0,0000	--
Chl	E36M61-146	9,8560	1	0,0020	0,0000	--
Chl	E36M61-150	7,1111	1	0,0080	0,0000	--
Aco2	WMS6	119,1105	4	0,0000	0,0349	0,0155
Aco2	E37M48-248	8,5333	2	0,0140	0,3022	0,0666
Aco2	E37M49-157	31,6690	2	0,0000	0,1249	0,0437
OP-W13-780	SCM138	17,0591	2	0,0000	0,1858	0,0818
OP-W13-780	E36M61-263	11,5885	1	0,0010	0,1472	0,1695
OP-W13-780	E37M48-84	13,9356	1	0,0000	0,1358	0,1676
OP-W13-780	E36M61-346	11,5885	1	0,0010	0,1472	0,1695
OP-W13-780	E33M48-119	18,2806	1	0,0000	0,0991	0,1720
OP-W13-780	E36M59-150	13,8586	1	0,0000	0,1171	0,1858
OP-W13-780	E37M48-213	18,9442	1	0,0000	0,0971	0,1695
OP-W13-780	E36M61-146	16,4904	1	0,0000	0,1263	0,1657
OP-W13-780	E36M61-150	18,9442	1	0,0000	0,0971	0,1695
<i>Xpsr360</i>	SCM138	33,8462	4	0,0000	0,0255	0,0253
<i>Xpsr360</i>	E33M60-259	13,9810	2	0,0010	0,1366	0,0636
<i>Xpsr360</i>	E36M61-263	19,9717	2	0,0000	0,1048	0,0535
<i>Xpsr360</i>	E37M48-84	19,9717	2	0,0000	0,1048	0,0535
<i>Xpsr360</i>	E36M61-346	19,9717	2	0,0000	0,1048	0,0535
<i>Xpsr360</i>	E36M59-83	29,5313	2	0,0000	0,0312	0,0298
<i>Xpsr360</i>	E33M48-119	13,6736	2	0,0010	0,1500	0,0666
<i>Xpsr360</i>	E37M48-248	28,9655	2	0,0000	0,0333	0,0307
<i>Xpsr360</i>	E36M59-150	18,5129	2	0,0000	0,1110	0,0558
<i>Xpsr360</i>	E37M48-213	18,5129	2	0,0000	0,1110	0,0558
<i>Xpsr360</i>	E36M61-146	17,5187	2	0,0000	0,1283	0,0591
<i>Xpsr360</i>	E36M61-150	10,0107	2	0,0070	0,2036	0,0740

Marker1	Marker2	χ^2	Freiheitsgrade	P	Rekombinationswert	Standardabweichung
<i>Xpsr929</i>	E33M60-259	21,0473	2	0,0000	0,1767	0,0632
<i>Xpsr929</i>	E36M61-263	27,0779	2	0,0000	0,1001	0,0462
<i>Xpsr929</i>	E37M48-84	34,9097	2	0,0000	0,0568	0,0346
<i>Xpsr929</i>	E36M61-346	34,0443	2	0,0000	0,0578	0,0352
<i>Xpsr929</i>	E36M59-83	27,1816	2	0,0000	0,0902	0,0483
<i>Xpsr929</i>	E33M48-119	27,9193	2	0,0000	0,0854	0,0437
<i>Xpsr929</i>	E37M48-248	24,9019	2	0,0000	0,1566	0,0576
<i>Xpsr929</i>	E36M59-150	29,7170	2	0,0000	0,0469	0,0350
<i>Xpsr929</i>	E37M48-213	33,7136	2	0,0000	0,0591	0,0356
<i>Xpsr929</i>	E36M61-146	35,7731	2	0,0000	0,0558	0,0339
<i>Xpsr929</i>	E36M61-150	23,9187	2	0,0000	0,1228	0,0511
<i>Xpsr628</i>	SCM138	36,6393	4	0,0000	0,1365	0,0467
<i>Xpsr628</i>	E33M60-259	27,4944	2	0,0000	0,1449	0,0555
<i>Xpsr628</i>	E36M61-263	21,8941	2	0,0000	0,1338	0,0522
<i>Xpsr628</i>	E37M48-84	27,2924	2	0,0000	0,1062	0,0457
<i>Xpsr628</i>	E36M61-346	25,2921	2	0,0000	0,1121	0,0479
<i>Xpsr628</i>	E36M59-83	35,1224	2	0,0000	0,0558	0,0367
<i>Xpsr628</i>	E33M48-119	27,4150	2	0,0000	0,0962	0,0448
<i>Xpsr628</i>	E37M48-248	31,3946	2	0,0000	0,1234	0,0497
<i>Xpsr628</i>	E36M59-150	25,9378	2	0,0000	0,0844	0,0450
<i>Xpsr628</i>	E37M48-213	29,6905	2	0,0000	0,0901	0,0425
<i>Xpsr628</i>	E36M61-146	31,7127	2	0,0000	0,0855	0,0406
<i>Xpsr628</i>	E36M61-150	32,8657	2	0,0000	0,0736	0,0385
<i>Xiag88</i>	SCM138	35,0721	4	0,0000	0,1530	0,0467
<i>Xiag88</i>	E33M60-259	25,2779	2	0,0000	0,1639	0,0554
<i>Xiag88</i>	E36M61-263	28,9788	2	0,0000	0,1087	0,0449
<i>Xiag88</i>	E37M48-84	31,0688	2	0,0000	0,1033	0,0429
<i>Xiag88</i>	E36M61-346	28,9788	2	0,0000	0,1087	0,0449
<i>Xiag88</i>	E36M59-83	27,3870	2	0,0000	0,1132	0,0486
<i>Xiag88</i>	E33M48-119	28,3109	2	0,0000	0,1104	0,0456
<i>Xiag88</i>	E37M48-248	25,2178	2	0,0000	0,1661	0,0547
<i>Xiag88</i>	E36M59-150	30,7465	2	0,0000	0,0803	0,0410
<i>Xiag88</i>	E37M48-213	33,6483	2	0,0000	0,0877	0,0400
<i>Xiag88</i>	E36M61-146	32,3359	2	0,0000	0,1001	0,0423
<i>Xiag88</i>	E36M61-150	26,0754	2	0,0000	0,1289	0,0483
<i>Xiag5</i>	SCM138	44,6178	4	0,0000	0,1191	0,0410
<i>Xiag5</i>	E33M60-259	25,2516	2	0,0000	0,1652	0,0556
<i>Xiag5</i>	E36M61-263	32,6126	2	0,0000	0,0899	0,0408
<i>Xiag5</i>	E37M48-84	34,7085	2	0,0000	0,0854	0,0391
<i>Xiag5</i>	E36M61-346	32,6126	2	0,0000	0,0899	0,0408
<i>Xiag5</i>	E36M59-83	36,7490	2	0,0000	0,0681	0,0378
<i>Xiag5</i>	E33M48-119	31,8666	2	0,0000	0,0912	0,0415
<i>Xiag5</i>	E37M48-248	34,0714	2	0,0000	0,1245	0,0475
<i>Xiag5</i>	E36M59-150	34,3592	2	0,0000	0,0597	0,0354
<i>Xiag5</i>	E37M48-213	37,3197	2	0,0000	0,0696	0,0357
<i>Xiag5</i>	E36M61-146	35,5287	2	0,0000	0,0829	0,0385
<i>Xiag5</i>	E36M61-150	23,6627	2	0,0000	0,1466	0,0515

Marker1	Marker2	χ^2	Freiheitsgrade	P	Rekombinationswert	Standardabweichung
<i>Xmwg77b</i>	E33M60-259	7,8971	1	0,0050	0,2560	0,1377
<i>Xmwg77b</i>	E36M59-83	5,7826	1	0,0160	0,2659	0,1452
<i>Xmwg77b</i>	E37M48-248	9,2898	1	0,0020	0,2393	0,1361
WMS6	E33M60-259	6,2663	2	0,0440	0,3372	0,0732
WMS6	E36M59-83	8,2548	2	0,0160	0,2940	0,0730
WMS6	E37M48-248	11,4728	2	0,0030	0,2677	0,0647
WMS6	E37M49-157	33,1436	2	0,0000	0,1117	0,0424
SCM138	E33M60-259	22,2628	2	0,0000	0,1030	0,0509
SCM138	E36M61-263	28,9673	2	0,0000	0,0812	0,0459
SCM138	E37M48-84	23,2804	2	0,0000	0,1514	0,0608
SCM138	E36M61-346	20,9991	2	0,0000	0,1635	0,0648
SCM138	E36M59-83	22,1019	2	0,0000	0,0633	0,0449
SCM138	E33M48-119	23,2804	2	0,0000	0,1514	0,0608
SCM138	E37M48-248	27,0968	2	0,0000	0,0769	0,0435
SCM138	E36M59-150	18,8999	2	0,0000	0,1687	0,0728
SCM138	E37M48-213	26,7423	2	0,0000	0,1293	0,0570
SCM138	E36M61-146	25,6302	2	0,0000	0,1415	0,0581
SCM138	E36M61-150	14,3082	2	0,0010	0,2200	0,0738
E33M60-259	E36M61-263	10,4843	1	0,0010	0,0000	--
E33M60-259	E37M48-84	10,6890	1	0,0010	0,0000	--
E33M60-259	E36M61-346	10,4843	1	0,0010	0,0000	--
E33M60-259	E36M59-83	33,2446	1	0,0000	0,0788	0,1389
E33M60-259	E33M48-119	10,4843	1	0,0010	0,0000	--
E33M60-259	E37M48-248	41,6142	1	0,0000	0,0674	0,1284
E33M60-259	E36M59-150	8,8542	1	0,0030	0,0000	--
E33M60-259	E37M48-213	11,0204	1	0,0010	0,0000	--
E33M60-259	E36M61-146	12,4560	1	0,0000	0,0000	--
E33M60-259	E36M61-150	8,5714	1	0,0030	0,0000	--
E36M61-263	E37M48-84	53,9176	1	0,0000	0,0307	0,1258
E36M61-263	E36M61-346	52,7150	1	0,0000	0,0317	0,1268
E36M61-263	E36M59-83	6,1833	1	0,0130	0,0000	--
E36M61-263	E33M48-119	49,3147	1	0,0000	0,0335	0,1300
E36M61-263	E37M48-248	8,1469	1	0,0040	0,0000	--
E36M61-263	E36M59-150	43,6367	1	0,0000	0,0377	0,1371
E36M61-263	E37M48-213	52,7150	1	0,0000	0,0317	0,1268
E36M61-263	E36M61-146	50,0576	1	0,0000	0,0459	0,1257
E36M61-263	E36M61-150	35,5926	1	0,0000	0,0996	0,1244
E37M48-84	E36M61-346	63,0000	1	0,0000	0,0000	--
E37M48-84	E36M59-83	7,0427	1	0,0080	0,0000	--
E37M48-84	E33M48-119	51,4565	1	0,0000	0,0320	0,1279
E37M48-84	E37M48-248	9,0074	1	0,0030	0,0000	--
E37M48-84	E36M59-150	50,2734	1	0,0000	0,0176	0,1348
E37M48-84	E37M48-213	59,3135	1	0,0000	0,0149	0,1250
E37M48-84	E36M61-146	56,2526	1	0,0000	0,0289	0,1239
E37M48-84	E36M61-150	41,9431	1	0,0000	0,0786	0,1240

Marker1	Marker2	χ^2	Freiheitsgrade	P	Rekombinationswert	Standardabweichung
E36M61-346	E33M48-119	49,3147	1	0,0000	0,0335	0,1300
E36M61-346	E37M48-248	8,8221	1	0,0030	0,0000	--
E36M61-346	E36M59-150	48,1983	1	0,0000	0,0184	0,1373
E36M61-346	E37M48-213	57,2543	1	0,0000	0,0156	0,1270
E36M61-346	E36M61-146	54,1800	1	0,0000	0,0301	0,1258
E36M61-346	E36M61-150	40,4600	1	0,0000	0,0813	0,1250
E36M59-83	E33M48-119	7,3017	1	0,0070	0,0000	--
E36M59-83	E37M48-248	43,6124	1	0,0000	0,0383	0,1358
E36M59-83	E36M59-150	7,7048	1	0,0060	0,0000	--
E36M59-83	E37M48-213	7,2692	1	0,0070	0,0000	--
E36M59-83	E36M61-146	8,4018	1	0,0040	0,0000	--
E36M59-83	E36M61-150	6,6150	1	0,0100	0,0000	--
E33M48-119	E37M48-248	8,6258	1	0,0030	0,0000	--
E33M48-119	E36M59-150	51,0000	1	0,0000	0,0000	--
E33M48-119	E37M48-213	55,1872	1	0,0000	0,0162	0,1291
E33M48-119	E36M61-146	53,0082	1	0,0000	0,0310	0,1268
E33M48-119	E36M61-150	50,5882	1	0,0000	0,0331	0,1289
E37M48-248	E36M59-150	7,2092	1	0,0070	0,0000	--
E37M48-248	E37M48-213	9,2611	1	0,0020	0,0000	--
E37M48-248	E36M61-146	10,4186	1	0,0010	0,0000	--
E37M48-248	E36M61-150	7,3010	1	0,0070	0,0000	--
E37M48-248	E37M49-157	4,1497	1	0,0420	0,2468	0,1170
E36M59-150	E37M48-213	54,0000	1	0,0000	0,0000	--
E36M59-150	E36M61-146	50,4374	1	0,0000	0,0172	0,1348
E36M59-150	E36M61-150	44,8875	1	0,0000	0,0363	0,1359
E37M48-213	E36M61-146	59,4489	1	0,0000	0,0147	0,1250
E37M48-213	E36M61-150	45,5921	1	0,0000	0,0637	0,1254
E36M61-146	E36M61-150	43,6825	1	0,0000	0,0768	0,1241

7.1.6 6R

Marker1	Marker2	χ^2	Freiheitsgrade	P	Rekombinationswert	Standardabweichung
β-Gal	OP-X4-850	6,5531	2	0,0380	0,2595	0,0819
β-Gal	OP-O3-1400	14,3139	2	0,0010	0,1888	0,0686
β-Gal	SCM180	32,7015	4	0,0000	0,1764	0,0490
β-Gal	E36M59-285	12,3864	2	0,0020	0,1721	0,0747
β-Gal	E33M61-217	6,7362	2	0,0340	0,2394	0,0811
β-Gal	E37M49-189	6,1554	2	0,0460	0,2237	0,0774
Est8	SCM2	16,4778	4	0,0020	0,2131	0,0529
Est8	SCM180	22,6257	4	0,0000	0,1468	0,0538
Est8	SCM28	47,3677	4	0,0000	0,0706	0,0310
Est8	<i>Xiag192</i>	15,0794	2	0,0010	0,0888	0,0591
Est8	E33M59-178	6,2308	2	0,0440	0,2548	0,0823
Aco1	OP-X4-850	36,6585	2	0,0000	0,1030	0,0391
Aco1	OP-O3-1400	40,5995	2	0,0000	0,1116	0,0398
Aco1	SCM180	14,6930	4	0,0050	0,2565	0,0536
Aco1	E37M48-149	11,7619	2	0,0030	0,2907	0,0660
Aco1	E33M48-115	15,8842	2	0,0000	0,2220	0,0593
Aco1	E36M59-285	18,9783	2	0,0000	0,1904	0,0585
Aco1	E33M48-196	7,7330	2	0,0210	0,3123	0,0704
Aco1	E37M49-189	29,2435	2	0,0000	0,1291	0,0463
OP-A20-450	<i>Xiag312</i>	49,8658	2	0,0000	0,0437	0,0254
OP-A20-450	<i>Xiag313</i>	28,5344	2	0,0000	0,0965	0,0412
OP-A20-450	<i>Xiag318</i>	28,2930	2	0,0000	0,0963	0,0411
OP-A20-450	OP-P11-1050	20,3541	1	0,0000	0,1102	0,1468
OP-A20-450	E33M48-161	27,8070	1	0,0000	0,0912	0,1372
OP-A20-450	E36M59-201/207	29,7846	1	0,0000	0,0726	0,1434
OP-A20-450	E36M59-145	29,7846	1	0,0000	0,0726	0,1434
OP-A20-450	E36M61-325	24,5768	1	0,0000	0,1123	0,1352
OP-A20-450	E33M48-115	4,4123	1	0,0360	0,0000	--
<i>Xiag229a</i>	WMS44	7,4084	1	0,0060	0,2279	0,1384
<i>Xiag229a</i>	SCM2	15,1299	2	0,0010	0,1999	0,0564
<i>Xiag229a</i>	SCM180	9,6600	2	0,0080	0,2348	0,0733
<i>Xiag229a</i>	SCM28	43,2143	2	0,0000	0,0375	0,0260
<i>Xiag229a</i>	<i>Xiag192</i>	38,0000	1	0,0000	0,0000	--
<i>Xiag229a</i>	E36M59-285	4,0901	1	0,0430	0,0000	--
<i>Xiag229a</i>	E33M48-196	16,5544	1	0,0000	0,1478	0,1350
<i>Xiag229a</i>	E33M61-217	5,7110	1	0,0170	0,2770	0,1289
<i>Xiag23</i>	WMS44	34,4589	2	0,0000	0,0495	0,0350
<i>Xiag23</i>	<i>Xiag312</i>	85,9158	4	0,0000	0,0439	0,0193
<i>Xiag23</i>	<i>Xiag313</i>	50,3746	4	0,0000	0,1206	0,0322
<i>Xiag23</i>	<i>Xiag318</i>	66,7510	4	0,0000	0,0782	0,0270
<i>Xiag23</i>	OP-P11-1050	16,0868	2	0,0000	0,1520	0,0581
<i>Xiag23</i>	OP-P15-750	33,9831	2	0,0000	0,0682	0,0374
<i>Xiag23</i>	OP-X12-500	21,1887	2	0,0000	0,1133	0,0548
<i>Xiag23</i>	SCM28	10,6855	4	0,0300	0,3862	0,0626
<i>Xiag23</i>	SCM304	34,8914	4	0,0000	0,1215	0,0414
<i>Xiag23</i>	E37M48-149	11,8963	2	0,0030	0,2691	0,0683
<i>Xiag23</i>	E33M48-161	16,6768	2	0,0000	0,1653	0,0546
<i>Xiag23</i>	E36M59-201/207	11,6913	2	0,0030	0,1795	0,0616

Marker1	Marker2	χ^2	Freiheitsgrade	P	Rekombinationswert	Standardabweichung
<i>Xiag23</i>	E36M61-325	17,0991	2	0,0000	0,1625	0,0537
<i>Xiag23</i>	E33M59-387	25,2502	2	0,0000	0,0965	0,0454
<i>Xiag23</i>	E33M59-178	7,2697	2	0,0260	0,4878	0,0857
<i>Xiag267b</i>	OP-X4-850	48,4202	1	0,0000	0,0339	0,1311
<i>Xiag267b</i>	OP-O3-1400	44,2037	1	0,0000	0,0659	0,1263
<i>Xiag267b</i>	SCM180	9,3238	2	0,0090	0,2760	0,0790
<i>Xiag267b</i>	E37M48-149	11,8670	1	0,0010	0,2360	0,1249
<i>Xiag267b</i>	E33M48-115	22,4470	1	0,0000	0,1488	0,1324
<i>Xiag267b</i>	E36M59-285	13,3680	1	0,0000	0,1997	0,1389
<i>Xmwig653</i>	WMS44	15,8118	2	0,0000	0,0465	0,0468
<i>Xmwig653</i>	<i>Xiag312</i>	62,4565	4	0,0000	0,0149	0,0148
<i>Xmwig653</i>	<i>Xiag313</i>	43,7500	4	0,0000	0,0203	0,0202
<i>Xmwig653</i>	<i>Xiag318</i>	48,0000	4	0,0000	0,0000	--
<i>Xmwig653</i>	OP-P11-1050	14,0105	2	0,0010	0,0858	0,0606
<i>Xmwig653</i>	OP-P15-750	24,0000	2	0,0000	0,0000	--
<i>Xmwig653</i>	SCM304	14,0000	4	0,0070	0,0000	--
<i>Xmwig653</i>	<i>Xiag192</i>	7,2979	2	0,0260	0,4038	0,1002
<i>Xmwig653</i>	E37M48-149	11,6643	2	0,0030	0,1266	0,0734
<i>Xmwig653</i>	E33M48-161	22,0000	2	0,0000	0,0000	--
<i>Xmwig653</i>	E36M59-201/207	21,0000	2	0,0000	0,0000	--
<i>Xmwig653</i>	E36M59-145	21,0000	2	0,0000	0,0000	--
<i>Xmwig653</i>	E36M61-325	16,7126	2	0,0000	0,0452	0,0451
<i>Xmwig653</i>	E33M59-387	17,0000	2	0,0000	0,0000	--
<i>Xmwig653</i>	E33M48-115	10,1496	2	0,0060	0,1017	0,0690
<i>Xmwig669</i>	WMS44	11,6129	2	0,0030	0,2193	0,0767
<i>Xmwig669</i>	<i>Xiag312</i>	36,1824	4	0,0000	0,1761	0,0377
<i>Xmwig669</i>	<i>Xiag313</i>	14,2791	4	0,0060	0,2642	0,0539
<i>Xmwig669</i>	<i>Xiag318</i>	20,2324	4	0,0000	0,2154	0,0502
<i>Xmwig669</i>	OP-P15-750	9,6863	2	0,0080	0,2617	0,0811
<i>Xmwig669</i>	OP-X12-500	15,3196	2	0,0000	0,1625	0,0637
<i>Xmwig669</i>	OP-X4-850	11,9510	2	0,0030	0,2254	0,0673
<i>Xmwig669</i>	OP-O3-1400	9,0262	2	0,0110	0,2789	0,0714
<i>Xmwig669</i>	E37M48-149	13,4166	2	0,0010	0,2377	0,0683
<i>Xmwig669</i>	E33M48-161	6,5323	2	0,0380	0,2996	0,0766
<i>Xmwig669</i>	E36M59-201/207	6,1308	2	0,0470	0,3042	0,0835
<i>Xmwig669</i>	E36M59-145	6,1308	2	0,0470	0,3042	0,0835
<i>Xmwig669</i>	E36M61-325	6,5323	2	0,0380	0,2996	0,0766
<i>Xmwig669</i>	E33M48-115	22,6951	2	0,0000	0,1419	0,0543
<i>Xpsr371</i>	WMS44	24,0000	2	0,0000	0,0000	--
<i>Xpsr371</i>	<i>Xiag312</i>	68,2951	4	0,0000	0,0438	0,0216
<i>Xpsr371</i>	<i>Xiag313</i>	22,5217	4	0,0000	0,1612	0,0487
<i>Xpsr371</i>	<i>Xiag318</i>	37,1111	4	0,0000	0,0830	0,0361
<i>Xpsr371</i>	OP-P15-750	17,8977	2	0,0000	0,0429	0,0412
<i>Xpsr371</i>	OP-X12-500	18,1858	2	0,0000	0,0716	0,0493
<i>Xpsr371</i>	SCM304	25,5610	4	0,0000	0,1589	0,0540

Marker1	Marker2	χ^2	Freiheitsgrade	P	Rekombinationswert	Standardabweichung
WMS44	<i>Xiag313</i>	23,6364	2	0,0000	0,0854	0,0464
WMS44	<i>Xiag318</i>	28,9655	2	0,0000	0,0282	0,0283
WMS44	OP-P15-750	39,0000	1	0,0000	0,0000	--
WMS44	OP-X12-500	11,3044	1	0,0010	0,1418	0,1913
WMS44	SCM28	7,0164	2	0,0300	0,1962	0,0708
WMS44	SCM304	22,0000	2	0,0000	0,0000	--
WMS44	<i>Xiag192</i>	7,8426	1	0,0050	0,1220	0,2142
WMS44	E37M48-149	8,8327	1	0,0030	0,2461	0,1507
WMS44	E33M59-387	16,3265	1	0,0000	0,0799	0,1754
SCM2	SCM28	23,9128	4	0,0000	0,1988	0,0465
SCM2	E36M59-285	7,9957	2	0,0180	0,2665	0,0787
SCM2	E33M61-217	21,1364	2	0,0000	0,1306	0,0533
SCM2	E33M59-178	23,3129	2	0,0000	0,1378	0,0541
<i>Xiag312</i>	<i>Xiag313</i>	54,1241	4	0,0000	0,1057	0,0309
<i>Xiag312</i>	<i>Xiag318</i>	79,7100	4	0,0000	0,0403	0,0199
<i>Xiag312</i>	OP-P11-1050	14,0965	2	0,0010	0,1683	0,0657
<i>Xiag312</i>	OP-P15-750	35,7265	2	0,0000	0,0253	0,0239
<i>Xiag312</i>	OP-X12-500	31,6118	2	0,0000	0,0270	0,0266
<i>Xiag312</i>	SCM304	32,9721	4	0,0000	0,1145	0,0420
<i>Xiag312</i>	<i>Xiag192</i>	7,6978	2	0,0210	0,3984	0,0984
<i>Xiag312</i>	E37M48-149	8,6844	2	0,0130	0,2914	0,0728
<i>Xiag312</i>	E33M48-161	20,4628	2	0,0000	0,1454	0,0528
<i>Xiag312</i>	E36M59-201/207	21,9914	2	0,0000	0,1199	0,0517
<i>Xiag312</i>	E36M59-145	21,9914	2	0,0000	0,1199	0,0517
<i>Xiag312</i>	<i>E36M61-325</i>	20,4628	2	0,0000	0,1454	0,0528
<i>Xiag312</i>	E33M59-387	14,0516	2	0,0010	0,1386	0,0549
<i>Xiag312</i>	E37M49-189	6,5882	2	0,0370	0,4732	0,0882
<i>Xiag313</i>	<i>Xiag318</i>	86,1927	4	0,0000	0,0372	0,0184
<i>Xiag313</i>	OP-P11-1050	26,9172	2	0,0000	0,0970	0,0476
<i>Xiag313</i>	OP-P15-750	35,5122	2	0,0000	0,0491	0,0318
<i>Xiag313</i>	OP-X12-500	16,2268	2	0,0000	0,1500	0,0621
<i>Xiag313</i>	SCM304	41,1439	4	0,0000	0,1030	0,0380
<i>Xiag313</i>	E37M48-149	15,0194	2	0,0010	0,2488	0,0653
<i>Xiag313</i>	E33M48-161	49,9056	2	0,0000	0,0177	0,0179
<i>Xiag313</i>	E36M59-201/207	36,5651	2	0,0000	0,0424	0,0299
<i>Xiag313</i>	E36M59-145	41,5725	2	0,0000	0,0214	0,0213
<i>Xiag313</i>	E36M61-325	45,3925	2	0,0000	0,0356	0,0251
<i>Xiag313</i>	E33M59-387	12,8000	2	0,0020	0,1728	0,0592
<i>Xiag313</i>	E33M48-115	7,4245	2	0,0240	0,2976	0,0721
<i>Xiag318</i>	OP-P11-1050	23,7431	2	0,0000	0,0770	0,0441
<i>Xiag318</i>	OP-P15-750	44,0000	2	0,0000	0,0000	--
<i>Xiag318</i>	OP-X12-500	20,2993	2	0,0000	0,1194	0,0587
<i>Xiag318</i>	SCM28	10,1408	4	0,0380	0,4999	0,0700
<i>Xiag318</i>	SCM304	50,0000	4	0,0000	0,0341	0,0239
<i>Xiag318</i>	<i>Xiag192</i>	7,0235	2	0,0300	0,2063	0,0912
<i>Xiag318</i>	E37M48-149	13,8676	2	0,0010	0,2334	0,0677
<i>Xiag318</i>	E33M48-161	35,8199	2	0,0000	0,0428	0,0297
<i>Xiag318</i>	E36M59-201/207	29,3060	2	0,0000	0,0492	0,0345

Marker1	Marker2	χ^2	Freiheitsgrade	P	Rekombinationswert	Standardabweichung
<i>Xiag318</i>	E36M61-325	32,0092	2	0,0000	0,0628	0,0356
<i>Xiag318</i>	E33M59-387	18,8768	2	0,0000	0,1321	0,0555
<i>Xiag318</i>	E33M48-115	9,7382	2	0,0080	0,2394	0,0700
OP-P11-1050	SCM304	17,5325	2	0,0000	0,0739	0,0519
OP-P11-1050	E33M48-161	24,9267	1	0,0000	0,0815	0,1549
OP-P11-1050	E36M59-201/207	19,9777	1	0,0000	0,0941	0,1604
OP-P11-1050	E36M59-145	19,9777	1	0,0000	0,0941	0,1604
OP-P11-1050	E36M61-325	18,9582	1	0,0000	0,1304	0,1493
OP-P15-750	OP-X12-500	9,9077	1	0,0020	0,1449	0,1841
OP-P15-750	SCM304	28,0000	2	0,0000	0,0000	--
OP-P15-750	<i>Xiag192</i>	6,1714	1	0,0130	0,1649	0,1974
OP-P15-750	E37M48-149	10,6547	1	0,0010	0,2386	0,1361
OP-P15-750	E33M59-387	24,4494	1	0,0000	0,0618	0,1554
OP-P15-750	E33M48-115	4,2783	1	0,0390	0,3372	0,1288
OP-X12-500	SCM28	6,1808	2	0,0450	0,2175	0,0734
OP-X12-500	SCM304	6,9174	2	0,0310	0,2058	0,0875
OP-X12-500	E37M48-149	4,4841	1	0,0340	0,3019	0,1454
OP-X12-500	E33M59-387	7,0824	1	0,0080	0,1646	0,1659
OP-X12-500	E33M48-115	5,6749	1	0,0170	0,2835	0,1513
OP-X12-500	E36M59-285	3,9130	1	0,0480	0,0000	--
OP-X4-850	OP-O3-1400	35,9009	1	0,0000	0,1075	0,1242
OP-X4-850	SCM180	8,7009	2	0,0130	0,2538	0,0735
OP-X4-850	E33M48-115	13,2991	1	0,0000	0,2217	0,1270
OP-X4-850	E36M59-285	24,4707	1	0,0000	0,1291	0,1385
OP-X4-850	E37M49-189	4,2066	1	0,0400	0,2423	0,1291
OP-O3-1400	SCM180	21,8341	2	0,0000	0,1378	0,0535
OP-O3-1400	E33M48-115	22,9825	1	0,0000	0,1566	0,1285
OP-O3-1400	E36M59-285	20,7042	1	0,0000	0,1508	0,1375
OP-O3-1400	E37M49-189	5,1986	1	0,0230	0,2268	0,1255
SCM180	SCM28	24,4901	4	0,0000	0,1949	0,0456
SCM180	<i>Xiag192</i>	7,7333	2	0,0210	0,1958	0,1258
SCM180	E36M59-285	17,2464	2	0,0000	0,1337	0,0611
SCM180	E33M48-196	6,2057	2	0,0450	0,2564	0,0764
SCM28	<i>Xiag192</i>	21,0000	2	0,0000	0,0000	--
SCM28	E36M59-285	11,3252	2	0,0030	0,2341	0,0685
SCM28	E33M48-196	17,4085	2	0,0000	0,1300	0,0485
SCM28	E33M61-217	8,4128	2	0,0150	0,2377	0,0663
SCM28	E33M59-178	12,5578	2	0,0020	0,1978	0,0602
SCM304	E33M48-161	9,4629	2	0,0090	0,1884	0,0734
SCM304	E36M59-201/207	6,3438	2	0,0420	0,2108	0,0853
SCM304	E36M59-145	10,0800	2	0,0060	0,1705	0,0770
SCM304	E36M61-325	12,1902	2	0,0020	0,1593	0,0676
SCM304	E33M59-178	7,2983	2	0,0260	0,4567	0,1075
<i>Xiag192</i>	E33M48-196	8,2949	1	0,0040	0,1175	0,2096
<i>Xiag192</i>	E37M49-189	7,0737	1	0,0080	0,1835	0,2094

Marker1	Marker2	χ^2	Freiheitsgrade	P	Rekombinationswert	Standardabweichung
E37M48-149	E36M59-145	5,4678	1	0,0190	0,0000	--
E37M48-149	E36M61-325	9,6585	1	0,0020	0,0000	--
E37M48-149	E33M59-387	23,5059	1	0,0000	0,1639	0,1317
E37M48-149	E33M48-115	14,0116	1	0,0000	0,2267	0,1203
E33M48-161	E36M59-201/207	47,4266	1	0,0000	0,0200	0,1373
E33M48-161	E36M59-145	42,1124	1	0,0000	0,0410	0,1371
E33M48-161	E36M61-325	41,2301	1	0,0000	0,0693	0,1262
E36M59-201/207	E36M59-145	48,8889	1	0,0000	0,0200	0,1348
E36M59-201/207	E36M61-325	37,7070	1	0,0000	0,0605	0,1355
E36M59-145	E36M61-325	42,9546	1	0,0000	0,0404	0,1358
E36M61-325	E33M48-115	5,4222	1	0,0200	0,2235	0,1205
E33M59-387	E33M48-115	6,1984	1	0,0130	0,3134	0,1210
E33M48-115	E37M49-189	5,3231	1	0,0210	0,2239	0,1235
E36M59-285	E33M61-217	5,5515	1	0,0180	0,0000	--
E36M59-285	E33M59-178	8,4200	1	0,0040	0,2692	0,1296
E36M59-285	E37M49-189	9,9798	1	0,0020	0,0000	--
E33M48-196	E33M61-217	14,6467	1	0,0000	0,1810	0,1295

7.1.7 7R

Marker1	Marker2	χ^2	Freiheitsgrade	P	Rekombinationswert	Standardabweichung
Acp2	SCM86	57,3341	2	0,0000	0,0309	0,0222
Acp2	SCM40	39,1111	2	0,0000	0,0232	0,0229
Acp2	E36M61-190	4,5123	1	0,0340	0,2401	0,1165
Acp2	E33M61-109	40,0972	1	0,0000	0,0565	0,1343
Acp2	E33M48-280	33,8962	1	0,0000	0,1033	0,1253
Acp2	E37M49-156	30,8015	1	0,0000	0,1104	0,1261
Acp3	SCM86	84,6045	4	0,0000	0,0659	0,0229
Acp3	SCM40	72,4210	4	0,0000	0,0456	0,0225
Acp3	E36M61-190	32,2244	2	0,0000	0,1263	0,0440
Acp3	E33M61-109	30,7538	2	0,0000	0,0934	0,0409
Acp3	E33M60-131	20,4766	2	0,0000	0,1747	0,0524
Acp3	E36M61-230	17,1900	2	0,0000	0,1858	0,0535
Acp3	E33M48-280	25,9584	2	0,0000	0,1516	0,0489
Acp3	E33M48-277	15,1515	2	0,0010	0,2099	0,0582
Acp3	E36M59-397	14,9135	2	0,0010	0,1990	0,0603
Acp3	E33M48-310	9,0250	2	0,0110	0,2600	0,0644
Acp3	E37M49-156	26,3885	2	0,0000	0,1414	0,0476
Xpsr129	SCM86	21,8931	4	0,0000	0,2189	0,0471
Xpsr129	SCM40	20,1845	4	0,0000	0,1892	0,0530
Xpsr129	OP-X4-600	18,0716	2	0,0000	0,1783	0,0533
Xpsr129	E36M61-190	10,5275	2	0,0050	0,2654	0,0685
Xpsr129	E33M61-109	7,5406	2	0,0230	0,2758	0,0755
Xpsr129	E33M60-131	13,4271	2	0,0010	0,2058	0,0619
Xpsr129	E36M61-230	7,5093	2	0,0230	0,2452	0,0666
Xpsr129	E33M48-280	12,0715	2	0,0020	0,2370	0,0662
Xpsr129	E33M48-277	16,9072	2	0,0000	0,1904	0,0602
Xpsr129	E36M59-397	17,0370	2	0,0000	0,1747	0,0622
Xpsr129	E33M48-310	37,0999	2	0,0000	0,0638	0,0351
Xpsr129	E37M48-153	11,8003	2	0,0030	0,2391	0,0646
Xpsr129	E33M48-198	19,2713	2	0,0000	0,1649	0,0556
Xpsr129	E37M49-156	7,9671	2	0,0190	0,2724	0,0706
Xpsr129	E37M49-281/284	12,3699	2	0,0020	0,2293	0,0646
Xiag229c	SCM86	11,0760	2	0,0040	0,2178	0,0642
Xiag229c	SCM40	12,1701	2	0,0020	0,1591	0,0666
Xiag229c	OP-X4-600	11,5294	1	0,0010	0,1983	0,1230
Xiag229c	E36M61-190	10,3985	1	0,0010	0,2314	0,1287
Xiag229c	E33M60-131	13,1348	1	0,0000	0,1752	0,1348
Xiag229c	E36M61-230	6,0000	1	0,0140	0,2179	0,1309
Xiag229c	E33M48-277	17,4024	1	0,0000	0,1633	0,1368
Xiag229c	E36M59-397	12,8835	1	0,0000	0,1710	0,1471
Xiag229c	E33M48-310	33,7662	1	0,0000	0,0681	0,1406
Xiag229c	E37M48-153	6,9429	1	0,0080	0,2624	0,1252
Xiag229c	E33M48-198	4,9959	1	0,0250	0,0000	--
Xiag229c	E37M49-281/284	7,7227	1	0,0050	0,2458	0,1289
Xiag111a	E33M48-277	7,2890	2	0,0260	0,2948	0,0753
Xiag111a	E36M59-397	7,3731	2	0,0250	0,2941	0,0803
Xiag111a	E33M48-310	16,9296	2	0,0000	0,1712	0,0583

Marker1	Marker2	χ^2	Freiheitsgrade	P	Rekombinationswert	Standardabweichung
<i>Xiag89</i>	SCM40	33,2059	4	0,0000	0,1307	0,0424
<i>Xiag89</i>	OP-X4-600	9,8182	2	0,0070	0,2246	0,0601
<i>Xiag89</i>	E36M61-190	9,1841	2	0,0100	0,2492	0,0665
<i>Xiag89</i>	E33M61-109	19,3522	2	0,0000	0,1316	0,0529
<i>Xiag89</i>	E33M60-131	16,1801	2	0,0000	0,1730	0,0564
<i>Xiag89</i>	E36M61-230	8,9616	2	0,0110	0,2154	0,0627
<i>Xiag89</i>	E33M48-280	24,6123	2	0,0000	0,1352	0,0499
<i>Xiag89</i>	E33M48-277	22,0462	2	0,0000	0,1439	0,0525
<i>Xiag89</i>	E36M59-397	25,3942	2	0,0000	0,1116	0,0493
<i>Xiag89</i>	E33M48-310	25,9478	2	0,0000	0,1241	0,0488
<i>Xiag89</i>	E33M48-198	6,2840	2	0,0430	0,2976	0,0727
<i>Xiag89</i>	E37M49-156	11,7643	2	0,0030	0,2146	0,0632
<i>Xiag300</i>	SCM86	17,1894	4	0,0020	0,2362	0,0506
<i>Xiag300</i>	SCM40	13,1657	4	0,0100	0,2474	0,0653
<i>Xiag300</i>	E33M48-310	7,4118	2	0,0250	0,4737	0,0943
<i>Xiag300</i>	E37M49-156	6,5735	2	0,0370	0,2661	0,0777
<i>Xiag301</i>	SCM86	10,2767	4	0,0360	0,3543	0,0763
<i>Xiag301</i>	SCM40	9,9301	4	0,0420	0,3443	0,0956
<i>Xiag301</i>	E33M60-131	6,5158	2	0,0380	0,4218	0,1059
OP-C13-1500	SCM86	36,9891	2	0,0000	0,0580	0,0329
OP-C13-1500	SCM40	20,3103	2	0,0000	0,1104	0,0527
OP-C13-1500	E36M61-190	4,8349	1	0,0280	0,0000	--
OP-C13-1500	E33M61-109	15,3125	1	0,0000	0,1578	0,1446
OP-C13-1500	E33M48-280	14,3591	1	0,0000	0,1887	0,1327
OP-C13-1500	E37M49-156	27,7528	1	0,0000	0,1049	0,1355
OP-N8-1200	SCM86	29,2291	2	0,0000	0,0923	0,0459
OP-N8-1200	SCM40	20,8053	2	0,0000	0,0691	0,0477
OP-N8-1200	E36M61-190	3,9613	1	0,0470	0,2507	0,1381
OP-N8-1200	E33M61-109	13,3333	1	0,0000	0,1713	0,1525
OP-N8-1200	E33M48-280	12,4383	1	0,0000	0,1864	0,1445
OP-N8-1200	E37M49-156	12,4383	1	0,0000	0,1864	0,1445
OP-M4-700	SCM86	7,3061	2	0,0260	0,2978	0,0721
OP-M4-700	E33M61-109	10,7754	1	0,0010	0,2393	0,1361
OP-M4-700	E33M48-280	4,7113	1	0,0300	0,3170	0,1218
OP-M4-700	E37M49-156	6,7563	1	0,0090	0,2752	0,1254
SCM86	SCM40	73,7778	4	0,0000	0,0126	0,0126
SCM86	E36M61-190	46,8759	2	0,0000	0,0345	0,0247
SCM86	E33M61-109	36,5931	2	0,0000	0,0449	0,0308
SCM86	E33M60-131	40,1467	2	0,0000	0,0537	0,0311
SCM86	E36M61-230	38,5417	2	0,0000	0,0577	0,0322
SCM86	E33M48-280	31,9396	2	0,0000	0,0948	0,0412
SCM86	E33M48-277	30,4029	2	0,0000	0,0918	0,0413
SCM86	E36M59-397	30,9422	2	0,0000	0,0645	0,0376
SCM86	E33M48-310	14,9574	2	0,0010	0,2002	0,0605
SCM86	E37M49-156	31,1792	2	0,0000	0,0834	0,0394

Marker1	Marker2	χ^2	Freiheitsgrade	P	Rekombinationswert	Standardabweichung
SCM40	E33M61-109	23,9498	2	0,0000	0,0646	0,0433
SCM40	E33M60-131	30,2631	2	0,0000	0,0480	0,0349
SCM40	E36M61-230	29,3109	2	0,0000	0,0519	0,0363
SCM40	E33M48-280	25,7154	2	0,0000	0,0801	0,0444
SCM40	E33M48-277	22,7362	2	0,0000	0,0960	0,0498
SCM40	E36M59-397	25,1250	2	0,0000	0,0568	0,0412
SCM40	E33M48-310	14,1414	2	0,0010	0,1604	0,0642
SCM40	E33M48-198	7,0201	2	0,0300	0,2720	0,0815
SCM40	E37M49-156	33,0586	2	0,0000	0,0294	0,0274
OP-X4-600	E36M61-190	7,9935	1	0,0050	0,2836	0,1182
OP-X4-600	E33M60-131	8,0592	1	0,0050	0,2589	0,1211
OP-X4-600	E36M61-230	4,4999	1	0,0340	0,2850	0,1191
OP-X4-600	E33M48-277	5,3790	1	0,0200	0,3064	0,1194
OP-X4-600	E36M59-397	10,0192	1	0,0020	0,2332	0,1337
OP-X4-600	E33M48-310	13,1478	1	0,0000	0,2136	0,1264
OP-X4-600	E37M48-153	48,6970	1	0,0000	0,0365	0,1289
OP-X4-600	E33M48-198	4,7353	1	0,0300	0,0000	--
OP-X4-600	E37M49-281/284	52,0355	1	0,0000	0,0187	0,1312
E36M61-190	E33M61-109	6,5854	1	0,0100	0,0000	--
E36M61-190	E33M60-131	42,7598	1	0,0000	0,0683	0,1273
E36M61-190	E36M61-230	41,9007	1	0,0000	0,0711	0,1262
E36M61-190	E33M48-280	8,3798	1	0,0040	0,0000	--
E36M61-190	E33M48-277	28,4585	1	0,0000	0,1240	0,1277
E36M61-190	E36M59-397	29,3233	1	0,0000	0,0997	0,1370
E36M61-190	E33M48-310	20,4897	1	0,0000	0,1677	0,1258
E36M61-190	E37M48-153	3,8710	1	0,0490	0,3417	0,1097
E36M61-190	E33M48-198	5,6676	1	0,0170	0,2235	0,1205
E36M61-190	E37M49-156	6,5611	1	0,0100	0,0000	--
E36M61-190	E37M49-281/284	4,6331	1	0,0310	0,3280	0,1117
E33M61-109	E33M60-131	5,0415	1	0,0250	0,0000	--
E33M61-109	E36M61-230	4,0058	1	0,0450	0,0000	--
E33M61-109	E33M48-280	42,7467	1	0,0000	0,0387	0,1371
E33M61-109	E33M48-277	5,3684	1	0,0210	0,0000	--
E33M61-109	E36M59-397	4,2429	1	0,0390	0,0000	--
E33M61-109	E37M49-156	33,2774	1	0,0000	0,0671	0,1392
E33M60-131	E36M61-230	60,0000	1	0,0000	0,0000	--
E33M60-131	E33M48-280	5,8741	1	0,0150	0,0000	--
E33M60-131	E33M48-277	48,4195	1	0,0000	0,0360	0,1300
E33M60-131	E36M59-397	45,5813	1	0,0000	0,0205	0,1400
E33M60-131	E33M48-310	28,1307	1	0,0000	0,1165	0,1280
E33M60-131	E37M48-153	6,0799	1	0,0140	0,2896	0,1158
E33M60-131	E37M49-156	4,8405	1	0,0280	0,0000	--
E33M60-131	E37M49-281/284	7,0949	1	0,0080	0,2730	0,1180
E36M61-230	E33M48-280	4,8980	1	0,0270	0,0000	--
E36M61-230	E33M48-277	41,8269	1	0,0000	0,0575	0,1308
E36M61-230	E36M59-397	39,7403	1	0,0000	0,0434	0,1397
E36M61-230	E33M48-310	21,1584	1	0,0000	0,1467	0,1279
E36M61-230	E37M49-156	4,2065	1	0,0400	0,0000	--

Marker1	Marker2	χ^2	Freiheitsgrade	P	Rekombinationswert	Standardabweichung
E33M48-280	E36M59-397	4,7980	1	0,0280	0,0000	--
E33M48-280	E37M49-156	36,1845	1	0,0000	0,0766	0,1303
E33M48-277	E36M59-397	41,0132	1	0,0000	0,0397	0,1398
E33M48-277	E33M48-310	30,5047	1	0,0000	0,1098	0,1283
E33M48-277	E33M48-198	4,6238	1	0,0320	0,2377	0,1205
E33M48-277	E37M49-156	5,4286	1	0,0200	0,0000	--
E33M48-277	E37M49-281/284	4,7987	1	0,0280	0,3157	0,1156
E36M59-397	E33M48-310	30,4748	1	0,0000	0,0848	0,1402
E36M59-397	E37M48-153	6,3860	1	0,0120	0,2863	0,1257
E36M59-397	E37M49-156	5,9688	1	0,0150	0,0000	--
E36M59-397	E37M49-281/284	7,6923	1	0,0060	0,2662	0,1273
E33M48-310	E37M48-153	9,9670	1	0,0020	0,2455	0,1210
E33M48-310	E33M48-198	7,4296	1	0,0060	0,0000	--
E33M48-310	E37M49-281/284	11,8981	1	0,0010	0,2258	0,1223
E37M48-153	E33M48-198	5,8741	1	0,0150	0,0000	--
E37M48-153	E37M49-281/284	56,6611	1	0,0000	0,0166	0,1270
E33M48-198	E37M49-281/284	5,9302	1	0,0150	0,0000	--

7.2 Molekularbiologische Medien

LB-Flüssigmedium (1 Liter):	10 g	Bactotrypton
	10 g	NaCl
	5 g	Hefeextrakt
		pH 7.5 (NaOH)
LB-Agar (1 Liter):	Zusammensetzung wie im Flüssigmedium zusätzlich 15g Agar	
20x SSC:	0,3 M	Na ₃ -Citrat
	3 M	NaCl
		pH 7.2 (NaOH)
50x TAE (1 Liter):	242 g	Tris
	57,1 ml	Eisessig
	100 ml	0,5 M EDTA (pH 8.0)
		pH 7.2
10x TBE (1 Liter):	107,8 g	Tris
	~ 55 g	Borsäure
	7,44 g	Na ₂ -EDTA-Dihydrat
		pH 8.3 (Borsäure)
1x TE:	10 mM	Tris (HCl), pH 8.0
	1 mM	EDTA

Sämtliche Lösungen wurden mit H₂O₂ angesetzt und autoklaviert.

LEBENS LAUF

Name: Bernhard Saal
Geboren: 4. April 1966 in Weilheim i. OB.
Familienstand: ledig

Schul Ausbildung

1972 - 1974 Grundschule Etting
1974 - 1976 Grundschule Eberfing
1976 - 1985 Gymnasium Weilheim i. OB.

Hochschulausbildung

Okt. 1987 - Sept. 1990 Studium der Gartenbauwissenschaften an der Technischen Universität München-Weihenstephan
Okt. 1990 - Jan. 1994 Studium der Gartenbauwissenschaften an der Universität Hannover
seit Febr. 1994 Promotionsstudium am Institut für Angewandte Genetik der Universität Hannover

Berufstätigkeit

Febr. 1994 - Dez. 1996 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Angewandte Genetik, der Universität Hannover