



Charakterisierung der Genomstruktur polyploider Dahlien mithilfe molekularer Marker

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

Dipl.–Ing. agr. Stephan Schie
geboren am 15.10.1978 in Wolfsburg

2013

Referent: Prof. Dr. Th. Debener

Korreferentin : PD Dr. A. Hohe

Tag der Promotion: 21.03.2013

Zusammenfassung

Die Gartendahlie (*Dahlia variabilis*) entwickelte sich aus den Dahlienwildarten, die Ende des 18. Jahrhunderts erstmals nach Europa gelangten. Heute ist die Gartendahlie eine beliebte Zierpflanze, die jedoch wissenschaftlich nur wenig untersucht wurde. Die bisherigen Analysen zeigten, dass sie polyploid ist und aus Hybridisierungen unterschiedlicher Arten hervorgegangen ist. Jedoch führten die Untersuchungen zu widersprüchlichen Hypothesen bezüglich der Ploidiestufe, des Ploidietypus und der Entstehung der Gartendahlie.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Genomstruktur von *D. variabilis* anhand von Mikrosatteliten- und AFLP®-Markern untersucht. Dafür wurden zwei Gartendahlie-Populationen, sowie verschiedene Wildarten verwendet. Die molekularen Analysen ergaben, dass *D. variabilis* oktoploid ist und eine polysome Vererbung aufweist. Deshalb ist auszuschließen, dass im Genom der Gartendahlie verschiedene Subgenome vorliegen, die getrennt voneinander vererbt werden. Aufgrund dessen ist davon auszugehen, dass die Ursprungsarten der Gartendahlie untereinander eine ähnliche Genomstruktur aufwiesen und ebenfalls autopolyploid waren.

Außerdem wurde eine Kopplungskarte für die Gartendahlie erstellt. Diese diente als Grundlage für die Berechnung von Markerassoziationen an züchterisch relevante Merkmale. Dabei konnten Assoziationen zwischen Markern und wichtigen Merkmalen wie den Blütenstandsdurchmesser, die Länge der Blütenstängel und die Anzahl der Blütenblätter nachgewiesen werden. Keines der untersuchten Merkmale spaltete nach den Mendelschen Gesetzen. Außerdem deuteten die Untersuchungen darauf hin, dass die Ausprägung vieler phänotypischer Merkmale der Gartendahlie in einem hohen Maße durch Umweltfaktoren beeinflusst wird.

Anhand interspezifischer Kreuzungen konnten zudem Arthybriden zwischen der oktoploiden Gartendahlie und der tetraploiden Wildart *D. macdougalii* erzeugt werden. Die Hybriden sind hexaploid und weisen im Gegensatz zu *D. variabilis* ein nicht determiniertes Wachstum des Blütenstängels auf. Aufgrund dessen bilden die Hybriden eine höhere Anzahl an Blüten an jedem Endtrieb als die Gartendahlie. Die erzeugten Arthybriden könnten einen Transfer des nicht determinierten Wachstums des Blütenstängels in das Zuchtmaterial der Gartendahlie ermöglichen.

Schlagwörter: *Dahlia variabilis*, polyploid, polysome Vererbung, Kopplungskarte, Arthybriden, Marker-Merkmalassoziationen, QTL, *Dahlia macdougalii*

Abstract

The garden dahlia (*Dahlia variabilis*) developed from dahlia wild species, that were introduced to Europe for the first time at the end of the 18th century. Although the garden dahlia is a popular ornamental plant, only few genetic analyses have been done to date. Some of the previous analyses indicated that *D. variabilis* is polyploid and originated from hybridizations between different species. However, several investigations led to contradictory hypotheses about the ploidy level, the ploidy type and the formation of the garden dahlia.

In the present study the genome structure of *D. variabilis* was investigated with microsatellite and AFLP[®] markers. Two garden dahlia populations and different wild species have been used for the analysis. The molecular analysis showed that *D. variabilis* is octoploid and has a polysomic inheritance. Thus, it can be excluded that the genome of the garden dahlia is composed of different subgenomes that are inherited separately from each other. As a consequence it can be assumed that the different ancestor species of the garden dahlia had similar genome structures and were also autopolyploid.

In addition, a linkage map for the garden dahlia was constructed. The linkage map was used to calculate marker associations to important breeding traits. Thereby, marker associations for some relevant traits such as the diameter of the flowers, the length of the pedicel and the number of petals could be detected. None of the characteristics segregated according to Mendel's laws. Furthermore, the studies indicated that the expression of many characteristics are strongly influenced by environmental factors.

Additionally, new species hybrids were generated from a cross between the octoploid garden dahlia and the tetraploid wildspecies *D. macdougalii*. The hybrids are hexaploid and, in contrast to *D. variabilis*, show an indeterminate growth of the flower stems. As a result of this, the hybrids form a higher number of flowers on each terminal shoot than garden dahlias. Therefore, the new species hybrids offer the possibility to transfer the indeterminate growth of the flower stems into the gene pool of the garden dahlia.

Key words: *Dahlia variabilis*, polyploid, polysomic inheritance, linkage map, species hybrids, marker-trait association, QTL, *Dahlia macdougalii*

I. Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung

Abstract

I.	Inhaltsverzeichnis	I
II.	Abkürzungsverzeichnis	V
III.	Abbildungsverzeichnis	VII
IV.	Tabellenverzeichnis	VIII
1.	Einleitung	1
1.1	Die Gattung <i>Dahlia</i>	1
1.1.1	Natürliches Vorkommen und Systematik.....	1
1.1.2	Historische Aspekte zur Entstehung der Gartendahlie	3
1.1.3	Wirtschaftliche Bedeutung von <i>Dahlia variabilis</i>	4
1.1.4	Zytologische und genetische Untersuchungen an Dahlien	4
1.1.5	Molekularbiologische Untersuchungen an Dahlien.....	5
1.2	Polyploidie bei Pflanzen.....	6
1.2.1	Bedeutung der Polyploidie für die Evolution und Artenbildung	12
1.3	Methoden zur Analyse polyploider Pflanzen	14
1.3.1	Zytologische Methoden für Untersuchungen von Polyploiden	14
1.3.2	Molekulare Methoden für Untersuchungen von Polyploiden	16
1.4	Hypothesen zur Genomstruktur von <i>Dahlia variabilis</i>	20
1.5	Ziele der Arbeit.....	21
2.	Material und Methoden	23
2.1	Verwendetes Pflanzenmaterial	23
2.1.1	Dahliensorten	23

2.1.2 Dahlienwildarten	23
2.1.3 Populationen.....	24
2.2 Kreuzungsversuche	24
2.3 Erhebung phänotypischer Merkmale	25
2.4 Zytologische Methoden	26
2.5 Molekulare Methoden	27
2.5.1 DNA-Extraktion	27
2.5.2 Transfer von Mikrosatellitenmarkern aus anderen Gattungen	28
2.5.3 Anreicherung einer DNA-Bank auf Mikrosatellitenmotive	28
2.5.4 Screening von 454-Sequenzen auf Mikrosatellitenmotive	29
2.5.5 Testung und Anwendung der Mikrosatelliten-Primerpaare.....	29
2.5.6 Anwendung der AFLP®-Technik	31
2.5.7 Polyacrylamid-Gelelektrophorese	33
2.6 Statistische Methoden.....	33
2.6.1 Berechnung des Verhältnisses von Singledosemarkern zu Multidosemarkern	33
2.6.2 Bestimmung des Verhältnisses von Attraktionskopplungen zu Repulsionskopplungen	35
2.6.3 Berechnung der Kopplungskarten	36
2.6.4 Marker- Merkmalsassoziationen.....	38
3. Ergebnisse	39
3.1 Entwicklung von Mikrosatellitenmarkern für <i>Dahlia variabilis</i>	39
3.2 Untersuchung der Genomstruktur von <i>Dahlia variabilis</i>	40
3.2.1 Analyse der Ploidiestufe von <i>Dahlia variabilis</i> mithilfe von Mikrosatellitenmarkern	40
3.2.2 Bestimmung des Ploidietypus von <i>Dahlia variabilis</i> anhand von Mikrosatellitenmarkern	42

3.2.3 Spaltungsanalysen in den Populationen K1 und K5	43
3.2.4 Verhältnis von Singledosemarkern zu Multidosemarkern für die Dahlienpopulation K5	46
3.2.5 Verhältnis von Attraktionskopplungen zu Repulsionskopplungen für die Dahlienpopulation K5	47
3.3 Genetische Kopplungskarte für die Dahlienpopulation K5	48
3.3.1 Maternale Karte	50
3.3.2 Paternale Karte	54
3.3.3 Identifizierung der Homöologengruppen von <i>Dahlia variabilis</i>	57
3.3.4 Beschreibung der Homöologengruppen	76
3.4 Assoziationen molekularer Marker an phänotypische Merkmale von <i>Dahlia variabilis</i>	78
3.4.1 <i>Kruskal-Wallis</i> -Test	79
3.4.2 QTL-Kartierung	81
3.4.3 Marker- Merkmalsassoziationen, die übereinstimmend durch das Interval Mapping und den <i>Kruskal-Wallis</i> -Test nachgewiesen wurden	88
3.5 Ergebnisse der interspezifischen Kreuzungsversuche	89
3.6 Durchflusszytometrie zur Bestimmung der Genomgröße der Nachkommen der interspezifischen Kreuzungsversuche	94
4. Diskussion	97
4.1 Untersuchungen der Genomstruktur von <i>Dahlia variabilis</i>	97
4.1.1 Bestimmung der Ploidiestufe von <i>Dahlia variabilis</i> durch Mikrosatellitenmarker	98
4.1.2 Nachweis polysomer Vererbung für <i>Dahlia variabilis</i> anhand der Spaltungsmuster von Mikrosatellitenmarkern	99
4.1.3 Kein eindeutiger Hinweis auf die Genomstruktur von <i>Dahlia variabilis</i> durch die Spaltungsanalyse für die Populationen K1 und K5	101
4.1.4 Bestätigung der Annahme einer polysomen Vererbung durch das Verhältnis von Singledosemarkern zu Multidosemarkern	104

4.1.5 Bestätigung einer oktosomen Vererbung für <i>Dahlia variabilis</i> durch das Verhältnis von Attraktionskopplungen zu Repulsionskopplungen	105
4.1.6 Zusammenfassung der Genomanalysen von <i>Dahlia variabilis</i>	106
4.2 Mögliche Mechanismen zur Förderung von Bivalenten bei <i>Dahlia variabilis</i>	107
4.3 Rückschlüsse auf die Entstehung von <i>Dahlia variabilis</i>	109
4.4 Genetische Kopplungskarten für die Eltern der Population K5	111
4.4.1 Identifizierung homologer und homöologer Kopplungsgruppen von <i>Dahlia variabilis</i>	113
4.5 Marker- Merkmalsassoziationen bei <i>Dahlia variabilis</i>	114
4.5.1 Nachweis von Marker- Merkmalsassoziationen bei <i>Dahlia variabilis</i> anhand des <i>Kruskal-Wallis</i> -Tests	114
4.5.2 Geringe Reproduzierbarkeit der detektierten QTLs für <i>Dahlia variabilis</i>	116
4.5.3 Mögliche Ursachen für die geringe Reproduzierbarkeit der berechneten QTLs.....	117
4.6 Konsequenzen für die Züchtung neuer Dahliensorten	119
4.7 Einsatz neuer Arthybriden für die Züchtung von Dahliensorten	124
4.8 Ausblick	126
5. Literaturverzeichnis	127
6. Anhang.....	143
Lebenslauf	157
Veröffentlichungen.....	158
Erklärung zur Dissertation.....	159
Danksagung.....	160

II. Abkürzungsverzeichnis

AFLP®	Amplified Fragment Length Polymorphism
BC1	Backcross1
bp	Basenpaare
C-Wert	Chromatinwert
CAPS	Cleaved Amplified Polymorphic Sequence
cM	centi Morgan
CP	Cross Pollination
df	degrees of freedom, Freiheitsgrade
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EST	Expressed Sequence Tag
ETS	External Transcribed Spacer
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
GISH	Genomische in situ Hybridisierung
HG	Homöologengruppe
IRD	Infrared Dye
ITS	Internal Transcribed Spacer
KG	Kopplungsgruppe
KGs	Kopplungsgruppen
LOD	Logarithm of Odds
MD-Marker	Multidosemarker
NA	not assigned, nicht zugeordnet
NOR	Nucleusorganisationsregion
PCR	Polymerase Chain Reaktion
pg	Pikogramm
<i>Ph1</i>	Pairing Homoeologus 1
QTL	Quantitative Trait Locus
QTLs	Quantitative Trait Loci
RAPD	Randomly amplified polymorphic DNA
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RNAi	Ribonukleinsäure Interferenz
SCAR	Sequence Characterized Amplified Region
SD-Marker	Singledosemarker

SN	Signifikanzniveau
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE.....	Tris-EDTA
U.....	Units, Einheiten
v/v.....	Volumen pro Volumen
var.	Varietät
Vol.....	Volumen
w/v.....	Gewicht pro Volumen
x	Basischromosomensatz

III. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Fixierte Heterozygotie.....	10
Abbildung 2: Spaltungsmuster des Mikrosatellitenmarkers DV09	43
Abbildung 3: Legende der berechneten Kopplungskarten.....	50
Abbildung 4: Kopplungsgruppen der Kartierungsmutter Karneol	51-53
Abbildung 5: Kopplungsgruppen des Kartierungsvaters Nordlicht.....	55-56
Abbildung 6: Homöologengruppen der Kartierungseltern.....	60-75
Abbildung 7: Hybridnachweis für die Nachkommen der interspezifischen Kreuzungsversuche.....	90
Abbildung 8: Blütenstängel der Wildart <i>D. macdougalii</i>	91
Abbildung 9: Blütenstängel der Gartendahliensorte Roxy	92
Abbildung 10: Blütenstängel des Arthybriden DH2007-417	93
Abbildung 11: Peaks der Durchflusszytometrie-Messung	94

IV. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung der Gattung <i>Dahlia</i>	2
Tabelle 2: Phänotypische Merkmale, die in der Population K5 erhoben wurden.....	26
Tabelle 3: Reaktionsbedingungen für die M13 Mikrosatelliten-PCR.....	31
Tabelle 4: PCR Reaktionsbedingungen für die AFLP®-Präamplifikation	32
Tabelle 5: PCR Reaktionsbedingungen für die AFLP®-Endreaktion.....	32
Tabelle 6: Anzahlen maximal amplifizierter Banden pro Genotyp	41
Tabelle 7: Spaltungsverhältnisse für die Population K1.....	44
Tabelle 8: Spaltungsverhältnisse für die Population K5.....	45
Tabelle 9: Verhältnis von SD-Markern zu MD-Markern für die Population K5	47
Tabelle 10: Das Verhältnis von Attraktionskopplungen zu Repulsionskopplungen für die Population K5	48
Tabelle 11: Ergebnisse der berechneten Kopplungskarten für die Population K5...	49
Tabelle 12: Anzahlen kartierter Mikrosatellitenmarker-Allele	58
Tabelle 13: <i>Kruskal-Wallis</i> -Test; signifikante Marker-Merkmalsassoziationen für Karneol	79
Tabelle 14: <i>Kruskal-Wallis</i> -Test; signifikante Marker-Merkmalsassoziationen für Nordlicht	80
Tabelle 15: Interval Mapping; signifikante Marker-Merkmalsassoziationen für Karneol	82
Tabelle 16: Interval Mapping; signifikante Marker-Merkmalsassoziationen für Nordlicht	86
Tabelle 17: Zusammenfassung des Hybridnachweises für die Nachkommen der interspezifischen Kreuzungsversuche	90
Tabelle 18: C-Werte für die erzeugten Arthybriden, deren Eltern und Nachkommen	95
Tabelle 19: verwendete Sorten, Genotypen und Dahlienwildarten	143
Tabelle 20: Spaltungsverhältnisse für Tetraploide.....	144

Tabelle 21: Spaltungsverhältnisse für Oktoploide	144
Tabelle 22: aus den Analysen ausgeschlossene Genotypen	145
Tabelle 23: verwendeter Bakterienstamm	145
Tabelle 24: RAPD Primersequenzen.....	146
Tabelle 25: Für den Transfer getestete Mikrosatellitenmarker	147
Tabelle 26: Oligonukleotide der Adaptoren für die AFLP [®] -Marker.....	148
Tabelle 27: Oligonukleotide für die Präamplifikation der AFLP [®] -Marker.....	148
Tabelle 28: Oligonukleotide für die Endreaktion der AFLP [®] -Marker	148
Tabelle 29: angewendete AFLP [®] -Primerkombinationen.....	148
Tabelle 30: verwendete Puffer und Lösungen	149
Tabelle 31: verwendete Geräte	150
Tabelle 32: Herstellerstandorte	151
Tabelle 33: Angaben zu den entwickelten Mikrosatellitenmarkern	152
Tabelle 34: LOD-Werte der berechneten Kopplungsgruppen von Karneol.....	153
Tabelle 35: LOD-Werte der berechneten Kopplungsgruppen von Nordlicht.....	154
Tabelle 36: Unterteilung der Kopplungsgruppen von Karneol in Homöologengruppen	155
Tabelle 37: Unterteilung der Kopplungsgruppen von Nordlicht in Homöologengruppen	156

1. Einleitung

1.1 Die Gattung *Dahlia*

1.1.1 Natürliches Vorkommen und Systematik

Die Gattung *Dahlia* ist innerhalb der Familie der *Asteraceae* in die Unterfamilie der *Asteroideae* eingeordnet. Sie weist ein breites Spektrum an morphologischen Unterschieden in Blattform, Blütenfarbe und Wuchshöhe auf.

Das natürliche Verbreitungsgebiet der Dahlienwildarten ist das Hochland von Mexiko und Zentralamerika, in einer Höhe zwischen 1500 und 4300 m (Sørensen 1969). Dort besiedeln sie kleinräumige, isolierte Verbreitungsgebiete. Oft wachsen sie in kleinen Gruppen auf offenen Flächen, wie an Waldrändern oder auf Waldlichtungen (Saar et al. 2003). Die Gattung umfasst die vier Sektionen *Dahlia*, *Entemophyllon*, *Pseudodendron* und *Epiphytum*, denen insgesamt 38 Arten zugeordnet sind (siehe Tabelle 1 auf Seite 2). Bereits innerhalb der Sektion *Dahlia* findet sich zwischen den 26 Arten dieser Sektion eine starke morphologische Vielfalt. Lawrence (1931) unterteilte diese Arten anhand der Blütenfarben in zwei Klassen. Klasse 1 umfasst Arten, die weiße bzw. violette Blütenblätter aufweisen, Klasse 2 hingegen Arten, die eine rote bzw. gelbe Blütenfarbe haben. Die Arten aus der Sektion *Dahlia* sind in der Regel krautige Pflanzen mit einer Wuchshöhe zwischen 0,7 und 1,7 Metern (Bertram 2000). Die Sektion *Entemophyllon* umfasst sieben Arten. Diese unterscheiden sich von den übrigen Arten durch ihre sehr fein gefiederten Blätter, die wechselständig angeordnet sind (Sørensen 1969). Die Sektion *Pseudodendron* besteht aus vier Arten, die alle als Baumdahlien bezeichnet werden. Sie wachsen bis zu neun Meter hoch und bilden, im Gegensatz zu den krautigen Mitgliedern der übrigen Sektionen, einen verholzten Stamm. Einzelne Blätter der Baumdahlien können 80 bis 90 Zentimeter lang werden (Sørensen 1969, Hansen 2007). Die Sektion *Epiphytum* besteht ausschließlich aus der Art *D. macdougallii*, die in der Natur epiphytisch auf Bäumen lebt. Diese Art bildet bis zu zehn Meter lange Sprosse. Sie ist die einzige Dahlienart, die Luftwurzeln bildet, welche eine Länge von über 20 Meter erreichen können (Hansen 2007). Wie viele andere Dahlienwildarten (Hansen und Hjerting 2000) ist *D. macdougallii* ebenfalls vom Aussterben bedroht (National Dahlia Society) und in nur wenigen Sammlungen erhalten (persönliche Mitteilung W. Ritschel).

Tabelle 1: Einteilung der Gattung *Dahlia* modifiziert nach Bertram (2000) auf der Grundlage von Sherff (1955) und Sørensen (1969), ergänzt durch Sørensen (1980), Sørensen (1987), Saar und Sørensen (2000), Saar (2002), Saar et al. (2002), Saar et al. (2003), Saar und Sørensen (2005) sowie Castro-Castro et al. (2012). In Klammern sind die Chromosomenanzahlen des unreduzierten Chromosomensatzes aufgeführt.

Sektion <i>Dahlia</i> (2n = 32, 64 oder 36)	Sektion <i>Entemophyllon</i> (2n = 34)	Sektion <i>Pseudodendron</i> (2n = 32)	Sektion <i>Epiphytum</i> (2n = 32)
Subsektion <i>Dahlia</i> (2n = 32 oder 64)	<i>D. scapigeroides</i> Sherff	<i>D. excelsa</i> Benthams	<i>D. macdougalii</i> Sherff
<i>D. apiculata</i> Sherff, Sørensen (2n = 32)	<i>D. foeniculifolia</i> Sherff	<i>D. imperialis</i> Roetzl ex Ortiges	
<i>D. cardiophylla</i> Blake und Sherff (2n = 32)	<i>D. linearis</i> Sherff	<i>D. tenuicaulis</i> Sørensen	
<i>D. purpusii</i> Brandegees	<i>D. rupicola</i> Sørensen	<i>D. campanulata</i> Sørensen, Hjerting und Saar	
<i>D. sorensenii</i> Hansen und Hjerting (2n = 64)	<i>D. dissecta</i> Watson		
<i>D. pteropoda</i> Sherff (2n = 64)	<i>D. congestifolia</i> Sørensen		
<i>D. brevis</i> Sørensen (2n = 32)	<i>D. sublignosa</i> Sørensen		
<i>D. rudis</i> Sørensen (2n = 32)			
<i>D. moorei</i> Sherff			
<i>D. hintonii</i> Sherff			
<i>D. mollis</i> Sørensen (2n = 32)			
<i>D. atropurpurea</i> Sørensen (2n = 64)			
<i>D. australis</i> Sherff, Sørensen (2n = 32 oder 64)			
var. <i>australis</i>			
var. <i>liebermannii</i> Sherff, Sørensen			
var. <i>chiapensis</i> Sørensen			
<i>D. sherffii</i> Sørensen (2n = 32 oder 64)			
<i>D. scapigera</i> Knowles und Westcott (2n = 32)			
<i>D. barkeriae</i> Knowles und Westcott (2n = 64)			
<i>D. tenius</i> Robinson und Greenman (2n = 32)			
<i>D. coccinea</i> Cavanilles (2n = 32 oder 64)			
<i>D. tubulata</i> Sørensen (2n = 32)			
<i>D. parvibracteata</i> Sørensen, Hjerting und Saar			
<i>D. hjertingii</i> Hansen und Sørensen			
<i>D. spectabilis</i> Sørensen, Hjerting und Saar			
<i>D. cuspidata</i> Sørensen, Hjerting und Saar			
<i>D. neglecta</i> Sørensen, Hjerting und Saar			
<i>D. pugana</i> Rodriguez und Castro			
<i>D. pinnata</i> Cavanilles ¹ (2n = 64)			
Subsektion <i>Merckii</i> (2n = 36)			
<i>D. merckii</i> Lehmann			

1 = *D. pinnata* ist vermutlich eine Hybride zwischen *D. coccinea* und *D. sorensenii*

Gatt et al. (2000) und Saar et al. (2003a) führten phylogenetische Analysen anhand der Internal Transcribed Spacer- (ITS-) und External Transcribed Spacer (ETS-) Sequenzen bei der Gartendahlie (*Dahlia variabilis*) sowie einigen Dahlienwildarten durch. Diese Untersuchungen bestätigten die Unterteilung der Arten nach Sørensen (1969) nur zum Teil. Dennoch ist diese allgemein anerkannt.

1.1.2 Historische Aspekte zur Entstehung der Gartendahlie

Erstmals wurden Dahlien von dem spanischen Arzt Francisco Hernandez während seiner Entdeckungsreise in Mexiko Ende des 16. Jahrhunderts schriftlich erwähnt. Nach Europa gelangten die ersten Dahliensamen 1790. Der Botaniker Vincente Cervantes sandte sie von Mexiko Stadt an den botanischen Garten in Madrid. Dort empfing sie Antonio Cavanilles, der 1791 erstmals ausführlich Dahlienwildarten beschrieb (Cavanilles 1791, Sørensen 1969). Im 17. und 18. Jahrhundert herrschte unter den Europäern eine allgemeine Begeisterung über die bis dahin unbekannt Pflanzen, die aus dem neu entdeckten Amerika nach Europa gelangten. Die Botanischen Gärten in Europa tauschten in den folgenden Jahren Dahliensaatgut untereinander aus. So gelangten Dahlien aus Madrid innerhalb weniger Jahre an die botanischen Gärten in England, Deutschland, Frankreich und Italien. Zusätzlich brachten Botaniker weitere Arten aus Mexiko nach Europa (Sørensen 1969).

Die erste Dahlie, die nach Europa gelangte, war wahrscheinlich *D. pinnata*, eine Hybride die vermutlich aus Kreuzungen zwischen unterschiedlichen Genotypen von *D. coccinea* mit *D. sorensenii* hervorging (Sørensen 1970, Hansen und Hjerting 1996). Letztlich wurden die Dahliensorten, die wahrscheinlich auf diese Hybride zurückzuführen sind, von Desfontaines (1829) unter der Bezeichnung *D. variabilis* zusammengefasst (Hansen und Hjerting 1996).

Es ist nicht genau geklärt, aus welchen Hybridisierungsereignissen *D. variabilis* hervorgegangen ist. Diesbezüglich gibt es unterschiedliche Hypothesen. Die Darstellung dieser Hypothesen erfordert die Erläuterung einiger Grundlagen bezüglich der Genomstruktur. Daher wird auf die entsprechenden Hypothesen in dem Kapitel 1.4 eingegangen. In der vorliegenden Arbeit wird *D. variabilis* aus formellen Gründen als eigenständige Art behandelt.

1.1.3 Wirtschaftliche Bedeutung von *Dahlia variabilis*

Die Gartendahlie ist eine beliebte Zierpflanze in der westlichen Welt, die für Beet- und Balkonbepflanzungen aber auch als Schnittblume genutzt wird. Es gibt zehn unterschiedliche Klassen wie z.B. Pompon-, Kaktus- und Halskrausendahlien, die anhand ihrer Blütenmorphologie unterschieden werden (Wegner und Debener 2008). Die Dahlie weist einige Eigenschaften auf, die ihre Kultur recht aufwendig gestalten. Sie besitzt Knollen, aus der die Pflanze jährlich neu austreibt, die allerdings nicht frostfest sind. Deshalb müssen die Knollen vor Frost geschützt überwintert werden. Zudem sind Dahlien anfällig für Echten Mehltau.

Inzwischen gibt es mehr als 15.000 Dahliensorten (Ern 1992). Im Jahre 2010 machten Dahlien einen Anteil von 8 % des Schnittblumensortimentes in Deutschland aus. Ihre Anbaufläche wurde für 2011 um 10 % erhöht. Damit lag die Dahlie in diesem Jahr in Deutschland auf Platz vier der Pflanzengattungen, die als Schnittblumen verwendet werden (AMI Anbauerhebung Frühjahr 2011).

1.1.4 Zytologische und genetische Untersuchungen an Dahlien

Bereits die ersten Chromosomenzählungen bei Dahlien von Ishikawa (1911) zeigten, dass einige Wildarten, sowie *D. variabilis*, $2n = 64$ Chromosomen besitzen, während es auch Wildarten mit $2n = 32$ Chromosomen gibt. Weitere Chromosomenzählungen an Dahlien wurden von Belling (1924), Lawrence (1929, 1931a), Turner et al. (1961), Sørensen (1969), Darlington (1973), Sundberg et al. (1986), Hansen und Hjerting (1996) und Gatt et al. (1998) durchgeführt. Die Untersuchungen haben gezeigt, dass innerhalb der Sektion *Dahlia* Arten mit $2n = 32$ Chromosomen und Arten mit $2n = 64$ Chromosomen vorzufinden sind. Für die Wildarten *D. australis*, *D. coccinea* und *D. sherfii* wurden jedoch auch Genotypen mit $2n = 32$ Chromosomen sowie Genotypen mit $2n = 64$ nachgewiesen (Sørensen 1969, Hansen und Hjerting 1996, Gatt et al. 1998). Bei den Chromosomenzählungen zeigte sich, dass Dahlien sehr kleine Chromosomen haben, deren Größe etwa 1,5 bis 3,5 μm beträgt (Gatt et al. 1998).

Untersuchungen von meiotischen Chromosomenpaarungen ergaben, dass Dahlienwildarten mit $2n = 32$ und $2n = 64$ Chromosomen sowie *D. variabilis* nahezu

ausschließlich Bivalente (Strukturen in denen jeweils zwei Chromosomen miteinander paaren) bilden (Lawrence 1929, 1931; Gatt et al. 1998).

Gatt et al. (1999 und 2000a) führten Kreuzungsversuche zwischen unterschiedlichen Dahlienwildarten sowie zwischen Wildarten und der Gartendahlie durch und untersuchten die meiotische Chromosomenpaarung der elterlichen Genome mit Hilfe der GISH- (Genomische in situ Hybridisierung) Methode (siehe 1.3.1).

Temsch et al. (2008) haben zudem durch Durchflusszytometrie die Genomgrößen für Dahlien mit $2n = 32$ Chromosomen (Mittelwert $2Cx = 2,35$ pg; unter der Annahme einer Tetraploidie) und $2n = 64$ Chromosomen (Mittelwert $2Cx = 2,18$ pg; unter der Annahme einer Oktoploidie) ermittelt. Die Grundlagen bezüglich der C-Werte sind unter Kapitel 1.3.1 aufgeführt.

Lawrence (1929, 1931), Lawrence und Scott Moncrieff (1935) und Giannasi (1975) führten Untersuchungen der Blütenpigmente bei Dahlien durch und stellten dabei fest, dass die Gartendahlie eine Kombination der Blütenpigmente von Wildarten aus der Klasse 1 und denen aus der Klasse 2 (siehe 1.1.1) aufweist. Zudem wurde gezeigt, dass *D. variabilis* die Blütenfarbe nicht nach dem Muster eines diploiden, sondern eines polyploiden Organismus vererbt (Lawrence 1931).

1.1.5 Molekularbiologische Untersuchungen an Dahlien

Um Informationen über die Genomstruktur von Dahlien zu erhalten, hybridisierten Gatt et al. (1998) eine Digoxigenin-markierte Sonde der 26S ribosomalen Ribonukleinsäure (rRNA), die einen Teil der Nukleolusorganisorregion (NOR) darstellt, gegen die Genome unterschiedlicher Dahlienwildarten sowie von *D. variabilis*. Die Untersuchungen zeigten, dass in dem Genom der Wildarten mit $2n = 32$ Chromosomen bis zu acht Kopien der gleichen 26S rRNA vorliegen können. Bei den Dahlienwildarten mit $2n = 64$ Chromosomen sowie der Gartendahlie wurden bis zu 16 Kopien identischer 26S rRNA nachgewiesen. Daraus folgerten die Autoren, dass die Wildarten mit $2n = 32$ Chromosomen aus mindestens einer Genomverdopplung hervorgingen und somit bereits polyploid sind (Gatt et al. 1998). Die übrigen molekularen Analysen bezüglich der Phylogenie bei Dahlien von Gatt et al. (2000) und Saar et al. (2003a) wurden bereits unter Kapitel 1.1.1 erwähnt.

Es wurden zudem einige Untersuchungen an *D. variabilis* anhand molekularer Marker durchgeführt. Diese befassten sich jedoch nicht mit der Genomstruktur bzw. der Entstehungsgeschichte der Gartendahlie, sondern mit der Entwicklung von Grundlagen für die Züchtung neuer Sorten. Behr und Debener (2004) fanden heraus, dass für *D. variabilis* bei offener Abblüte kaum Selbstungen und hohe Anteile an Fremdbestäubungen zu erwarten sind. Wird die Blüte hingegen vor Fremdbestäubungen geschützt, sind Selbstungen möglich. Die Nachkommen, die aus diesen Selbstungen hervorgingen, wiesen keine phänotypischen Anzeichen von Inzuchtdepression auf. Dies ist eine grundlegende Beobachtung für die Entwicklung von Zuchtstrategien für neue Dahliensorten, da in nahezu allen auskreuzenden Arten Inzucht zu einer verminderten Vitalität der Nachkommen führt (Wricke und Weber 1986). Viele Züchtungsprogramme enthalten jedoch oft mindestens einen Selbstungsschritt (Kawuki et al. 2011).

In einer Analyse von Dahliensorten unterschiedlicher Züchter anhand molekularer Marker fanden Wegner und Debener (2008) heraus, dass die genetische Diversität zwischen den verschiedenen Sorten recht hoch ist. Die Dahliensorten aus den unterschiedlichen Genpools verschiedener Züchter sowie Sorten, die untereinander morphologisch sehr ähnlich sind, wiesen ebenfalls diesen hohen Grad an genetischer Diversität auf. Daraus folgerten die Autoren, dass die Ausprägung bestimmter züchterisch relevanter Merkmale von einer relativ geringen Anzahl an Genen gesteuert wird. Deshalb empfehlen sie für die Züchtung neuer Sorten ein weites Spektrum an unterschiedlichen Sorten mit verschiedenen morphologischen Eigenschaften als Ausgangsmaterial mit einzubeziehen. Zudem sollte die Überführung bestimmter einzelner Merkmale in einen Genpool möglich sein, ohne drastische negative Effekte auf die Ausprägung der übrigen züchterisch relevanten Merkmale nach sich zu ziehen (Wegner und Debener 2008).

1.2 Polyploidie bei Pflanzen

Es ist davon auszugehen, dass die Dahlienwildarten mit $2n = 32$ Chromosomen bereits mindestens eine Genomverdopplung vollzogen haben (Gatt et al. 1998). Da *D. variabilis* mit $2n = 64$ Chromosomen den doppelten Chromosomensatz dieser Wildarten aufweist, ist anzunehmen, dass die Entstehung der Kulturform auf

mindestens eine weitere Genomaufdopplung zurückzuführen ist. Dies deutet darauf hin, dass *D. variabilis* ein komplexer polyploider Organismus ist. Bevor die Hypothesen bezüglich der Genomstruktur der Kulturform dargestellt werden, sollen daher zunächst einige Definitionen und Aspekte bezüglich der Polyploidie bei Pflanzen erläutert werden.

Homologe Chromosomen weisen untereinander die gleiche Struktur, z.B. in Bezug auf die Chromosomenlänge und Lage des Centromeres auf. Sie besitzen die Gene für dieselben Merkmale in derselben Abfolge und werden in der Regel in gleicher Anzahl von der Mutter sowie vom Vater an einen Nachkommen vererbt. Während der Meiose paaren sich homologe Chromosomen und rekombinieren durch den Mechanismus des Crossing Overs miteinander (Pikaard 2001, Ramsey und Schemske 2002).

Homöologe Chromosomen hingegen stammen von zwei unterschiedlichen Arten. Daher weisen sie untereinander Strukturunterschiede auf und können deshalb, im Gegensatz zu homologen Chromosomen, nicht miteinander rekombinieren, wenn sie durch eine Arthybridisierung in ein und denselben Organismus gelangen (Pikaard 2001, Ramsey und Schemske 2002).

Polyploide Organismen besitzen eine höhere Anzahl an Chromosomen als diploide Organismen der gleichen Gattung. Dies ist die Folge einer teilweisen oder vollständigen Aufdopplung des Chromosomensatzes der diploiden Form. Die verschiedenen Typen der Polyploidie werden im Folgenden erläutert.

Im Genom von aneupolyploiden Organismen liegen ein oder mehrere Chromosomen des Basischromosomensatzes (x) in aufgedoppelter Form vor (Grant 1981). Ein Beispiel für Aneupolyploidie und die daraus resultierenden Konsequenzen für den Phänotyp des betroffenen Organismus stellt *Datura stramonium* dar. Von dieser Art existieren verschiedene aneuploide Formen, die jeweils ein bestimmtes Chromosom in doppelter Ausführung aufweisen. Je nachdem welches Chromosom aufgedoppelt im Genom vorliegt, hat dies eine spezifische Abnormität in der Fruchtform des jeweiligen Genotyps zur Folge (Blakeslee 1921, 1934).

Im Gegensatz zu Aneupolyploiden besitzen eupolyploide Organismen eine höhere Anzahl des gesamten Basischromosomensatzes gegenüber der diploiden Form (Gray 1986). Somit weisen eupolyploide Organismen mindesten drei Ausführungen des haploiden Chromosomensatzes auf. Wesentlich häufiger kommen Polyploide

mit geraden Ploidiestufen vor, wie z.B. Tetraploide (4x), Hexaploide (6x) oder Oktoploide (8x). Die zwei häufigsten Ploidietypen bei Eupolyploiden sind neben der Endopolyploidie die Allopolyploidie und die Autopolyploidie (Kihara und Ono 1926, Stebbins 1947).

Autopolyploide Organismen entstehen auf natürliche Weise in der Regel durch die Fusion zweier unreduzierter Gameten innerhalb einer Art (Belling 1924). Auf diese Weise werden zwei komplette Genome, die strukturell sehr ähnlich sind, in einem einzelnen Organismus vereint. Dadurch liegen im Genom eines autopolyploiden Organismus zwar erhöhte Anzahlen an homologen, jedoch keine homöologen Chromosomen vor. Wenn während der Meiose mehr als zwei homologe Chromosomen vorhanden sind, bilden diese i.d.R. Strukturen, in denen alle entsprechenden Homologen miteinander paaren. Diese Strukturen werden als Multivalente bezeichnet. In diesen Multivalenten ist eine freie Rekombination zwischen allen beteiligten homologen Chromosomen zu erwarten. Deshalb ist für Autopolyploide von einer freien und intergenomischen Rekombination zwischen den Ursprungsgenomen auszugehen. Unter dieser freien Paarung der homologen Chromosomen sind somit alle möglichen Kombinationen der Allele für ein Merkmal möglich. Diese Art der Vererbung wird als polysome Vererbung bezeichnet (Stebbins 1947). Erfolgt die freie Paarung und Rekombination bei autotetraploiden Organismen zwischen vier homologen Chromosomen, wird die Vererbung als tetrasome Vererbung bezeichnet. Autooktoploide mit acht homologen Chromosomen weisen hingegen eine oktosome Vererbung auf. Unter der Ausbildung von Multivalenten während der Meiose kann es zu einem Effekt kommen, der als Doppelreduktion bezeichnet wird. Dabei gelangen zwei Allele von Schwesterchromatiden in denselben Gameten (Mather 1936). Dieser Effekt muss bei Spaltungsanalysen autopolyploider Organismen berücksichtigt werden, da er Auswirkungen auf die Spaltungsverhältnisse von Merkmalen bzw. Markern haben kann (Mather 1936). Daher kann es bei der Vererbung betroffener Merkmale bzw. molekularer Marker zu Abweichungen gegenüber den mendelschen Regeln kommen (Luo et al. 2006).

Allopolyploide Organismen hingegen entstehen in der Natur meist durch die Fusion zweier unreduzierter Gameten von zwei verschiedenen diploiden Arten. In der Regel sind die Arten, die zu einem allopolyploiden Organismus fusionieren, zwar miteinander verwandt, jedoch bestehen zwischen den Genomen der Ursprungsarten

Strukturunterschiede. Aufgrund dieser Strukturunterschiede stellen die beiden Ausgangsgenome zwei Subgenome in einem allotetraploiden Organismus dar. Die einander entsprechenden Chromosomensätze innerhalb eines jeden diploiden Subgenomes sind homolog, zwischen den beiden Subgenomen jedoch homöolog (Ramsey und Schemske 2002). Während der Meiose paaren und rekombinieren ausschließlich die homologen Chromosomen innerhalb eines Subgenomes miteinander, die homöologen jedoch nicht. Es herrscht also eine präferentielle Paarung der beiden homologen Chromosomen innerhalb eines jeden diploiden Subgenomes. Daher bilden Allopolyploide während der Meiose eine hohe Frequenz an Bivalenten. Die daraus resultierende Art der Vererbung wird als disome Vererbung bezeichnet (Stebbins 1947), da jeweils zwei homologe Chromosomen der diploiden Subgenome miteinander paaren und rekombinieren. In Folge dessen findet keine intergenomische Rekombination zwischen den elterlichen Subgenomen statt. Daher ist für Allopolyploide nicht mit einer freien Kombination aller Allele für ein Merkmal bzw. für einen Genort zu rechnen.

Ein typisches Merkmal von Allopolyploiden ist die fixierte Heterozygotie (Carson 1967). Fixierte Heterozygotie entsteht, wenn zwei diploide Genome, die für einen Locus polymorphe homozygot dominante Allele aufweisen, zu einem allopolyploiden Organismus fusionieren. Da in diesem die beiden diploiden Subgenome nicht miteinander rekombinieren können, gelangen beide Allele der diploiden Ursprungsarten für den entsprechenden Locus in jeden Gameten, den der allopolyploide Organismus bildet. In der gesamten Nachkommenschaft liegen diese beiden Allele demzufolge in einer heterozygoten Konstellation fixiert vor (Sybenga 1969), wie in der folgenden Abbildung 1 dargestellt ist.

Fixierte Heterozygotie

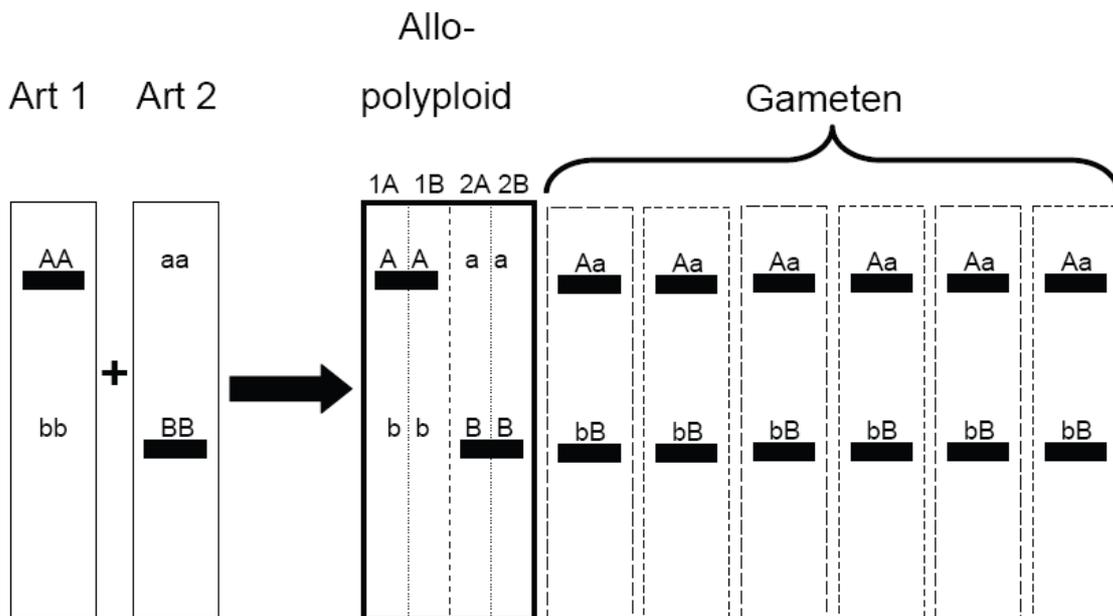


Abbildung 1: Fixierte Heterozygotie bei Allopolyploiden. Die diploiden Arten 1 und 2 fusionieren zu einem Allopolyploiden. Bei der Gametenbildung gelangt jeweils ein homologes Chromosom (1A bis 2B) eines der beiden diploiden Subgenomes des Allopolyploiden in einen Gameten, weshalb diese in fixierter Heterozygotie vorliegen.

Dies stellt für den entsprechenden Organismus unter evolutionären Aspekten einen Vorteil dar. Da die Heterozygotie die Grundlage für Heterosis ist, kann für den allopolyploiden Organismus eine Mehrleistung gegenüber seinen diploiden Vorfahren für das entsprechende Merkmal erwartet werden (Soltis und Soltis 2000). Zudem setzen sich natürlich entstandene allopolyploide Populationen meist zunächst aus nur wenigen Individuen zusammen, weshalb für diese ein erhöhtes Risiko der Inzuchtdepression besteht. Die fixierte Heterozygotie puffert diese ab und bleibt sogar bei einer Selbstbefruchtung erhalten. Auf diese Weise wird die Akkumulation rezessiver Merkmale, die zu Inzuchtdepression führen kann, verhindert (Soltis und Soltis 2000).

Jedoch haben die Genomhybridisierung und der daraus resultierende Anstieg an Komplexität des Vererbungsmechanismus nicht ausschließlich Vorteile für den betroffenen Organismus. Vor allem für autopolyploide Organismen, die während der Meiose eine hohe Frequenz an Multivalenten bilden, besteht das Risiko unbalancierte Gameten zu produzieren. Dies kann direkt oder in nachfolgenden

Generationen zu einer verminderten Fertilität führen (Howard 1938, Stebbins 1947, Gottschalk 1976). In besonderem Maße trifft dies für Organismen mit einer ungeraden Anzahl an Basischromosomensätzen zu (Griffiths et al. 1999). Vermutlich ist dies eine der Ursachen dafür, dass polyploide Organismen nach der Genomverdopplung einen Prozess durchlaufen, der als Diploidisierung bezeichnet wird (Song et al. 1995, Wolfe 2001, Kashkush et al. 2002). Die Diploidisierung erfolgt gewöhnlich über mehrere Generationen und kann über mehrere Millionen Jahre andauern (Soltis und Soltis 1993, Doyle et al. 2008). Dabei entwickelt sich ein polyploider Organismus auf zytologischer und genetischer Ebene wieder in einen diploiden. Während dieses Prozesses behält er die höhere Anzahl an Chromosomen, die er in Folge der Genomverdopplung besitzt, bei. Während der Diploidisierung erfolgt eine Strukturveränderung der Chromosomen, die dazu führt, dass größere Homologengruppen in strukturell gleiche Homologen-Paare aufgetrennt werden (Wolfe 2001). Dies hat zur Folge, dass auf zytologischer Ebene während der Meiose eine verminderte Frequenz an Multivalenten, und stattdessen verstärkt Bivalente, gebildet werden. Auf genetischer Ebene führt die Diploidisierung zu einer Reduktion redundanter Loci. Auf diese Weise wird das Risiko unbalancierter Gameten auszubilden gemindert. Dadurch werden die Faktoren, die zu Sterilität führen können, verringert (Doyle 1963, Sybenga 1969). Ist der Prozess der Diploidisierung vollzogen, kann der ehemals polyploide Organismus eine weitere Genomverdopplung durchlaufen (Adams und Wendel 2005, Doyle et al. 2008). Dieser Prozess der Diploidisierung folgt direkt auf die Genomverdopplung und kann besonders in den ersten Generationen nach der Polyploidisierung drastische Effekte auf die Genomstruktur der entsprechenden Nachkommen haben (McClintock 1984, Feldman et al. 1986, Soltis und Soltis 1993). Daher ist die genetische Konstitution eines betroffenen Individuums kein statischer Zustand, sondern unterliegt vielmehr einem dynamischen Prozess (Ramsey und Schemske 2002). Deshalb ist es häufig nicht möglich den Ploidiestatus eines Organismus eindeutig einer der oben aufgeführten Kategorien zuzuordnen. Dies sagte bereits Stebbins (1947) bei der Unterteilung beider Ploidietypen voraus. Häufig reicht daher eine zytologische oder molekulare Methode allein nicht aus um den Ploidietypus eines Organismus eindeutig zu klassifizieren.

1.2.1 Bedeutung der Polyploidie für die Evolution und Artenbildung

Bereits ältere Untersuchungen haben gezeigt, dass 50 bis 70 % aller Arten der Blütenpflanzen mindestens eine Genomverdopplung in ihrer Entwicklung vollzogen haben (Stebbins 1971, Soltis und Soltis 1993, Masterson 1994). Neuere Untersuchungen hingegen deuten darauf hin, dass wahrscheinlich alle Blütenpflanzen im Laufe ihrer Entwicklungsgeschichte mindestens eine Genomverdopplung durchlaufen haben (Otto und Whitton 2000, Cui et al. 2006). Somit scheint die Polyploidisierung einen wichtigen Faktor für die gesamte Evolution und Artenbildung der Blütenpflanzen darzustellen (Clausen et al. 1945, Stebbins 1950, Grant 1981). Eine Hypothese bezüglich der Bedeutung der Polyploidie für die Evolution basiert auf einem Aspekt der genetischen Diploidisierung und wird im Folgenden erläutert.

Da in einem, beispielsweise tetraploiden Organismus, zwei diploide Genome vereint sind, liegt für jeden Genort die DNA-Sequenz beider diploider Ausgangsgenome in diesem Organismus vor. Aufgrund dieser Redundanz kann eine der elterlichen DNA-Sequenzen für ein Merkmal Mutationen akkumulieren, während die Funktion für dieses Merkmal von dem anderen diploiden Elterngenom aufrechterhalten wird. Somit ist die metabolische Funktionalität in dem polyploiden Organismus für das entsprechende Merkmal gewährleistet, wodurch die ggf. negativen Effekte einer Mutation abgepuffert werden können. Polyploide weisen deshalb eine höhere Toleranz gegenüber Mutationen als ihre diploiden Verwandten auf (Kellogg 2003). Dadurch verfügen polyploide Organismen über das Potential zusätzliche Variationen für ein Merkmal auszubilden (Doyle et al. 2008). Durch diese erhöhte Variation in der Ausprägung von Merkmalen besitzen Polyploide unter evolutionären Gesichtspunkten einen Vorteil gegenüber ihren diploiden Verwandten (Kellogg 2003). Ein weiterer Aspekt der Diploidisierung basiert auf der Neuorganisation des Genomes des polyploiden Organismus, die auf eine Genomverdopplung folgt (Liu und Wendel 2002). Dieser Prozess hat besonders in den ersten Generationen nach einem Hybridisierungsereignis drastische Auswirkungen auf die Genomstruktur (McClintock 1984, Feldman 1997). Die dabei involvierten Mechanismen umfassen u.a. eine erhöhte Aktivität von Transposons (McClintock 1984, Zhao et al. 2008), epigenetische Effekte durch Änderungen der DNA-Methylierung (Song et al. 1995,

Comai et al. 2000), den Ausschluss repetitiver- (Feldman et al. 1997, Pestsova et al. 1998) und ribosomaler DNA-Sequenzen (Volkov et al. 1999), Gendosis-kompensation (Galili und Feldman 1984) sowie Gen-„Silencing“ (Stilllegung) durch Ribonukleinsäure Interferenz (RNAi). Diese Prozesse der strukturellen Veränderung des Genomes, in Kombination mit der langfristigen Akkumulation von Mutationen (siehe oben), führen zu einer Neuorganisation großer Bereiche des Genomes sowie einer Diversifizierung, Neofunktionalisierung und Subfunktionalisierung einzelner Gene (Adams und Wendel 2005). Dadurch können Polyploide neue Genfunktionen generieren, die zur Ausprägung anderer morphologischer Merkmale, metabolischer Prozesse und Eigenschaften im Reproduktionsmechanismus gegenüber ihren diploiden Ursprungsarten führen können (Doyle et al. 2008). Deshalb und in Folge ihrer komplexeren Vererbung sind Polyploide in einem höheren Maße als Diploide in der Lage sich an vielfältigere Umweltbedingungen sowie biotische Stressfaktoren anzupassen. Wahrscheinlich haben sie deshalb oft weitere Verbreitungsgebiete als ihre diploiden Verwandten. So ist häufig zu beobachten, dass in Gegenden mit extremen Klimaten wie z.B. in exponierten Höhenlagen (Meyer und Scharl 1999, Ohno 1999) und in arktischen Regionen (Nadeau und Sankoff 1997, Wang und Gu 2000) polyploide Organismen in höheren Frequenzen vorzufinden sind.

Polyploide Pflanzen weisen außerdem physiologische Eigenschaften auf, die zu Vorteilen in der Fortpflanzung gegenüber ihren diploiden Verwandten führen können. Diese resultieren daraus, dass sie oft größere Blüten (Husband und Schemske 2000) besitzen, höher wachsen und ein weiteres Spektrum an Blütenpigmenten kombinieren können. Häufig wurde beobachtet, dass polyploide Blütenpflanzen einen intensiveren Blütenduft als ihre diploiden Vorfahren aufweisen (Comai 2005). Die Intensivierung solcher optischer bzw. volatiler Reize oder eine verlängerte Blühphase können Bestäuberinsekten dazu veranlassen solche polyploiden Organismen in höherer Frequenz anzufliegen als deren diploide Verwandte (Segraves und Thompson 1999, Kennedy et al. 2006). Zudem weisen Polyploide häufig geringere Raten an Selbstinkompatibilität und Inzuchtdepression als Diploide auf, wodurch sie besser in der Lage sind erfolgreich Populationen in neuen Habitaten zu etablieren (Barringer 2007). Diese Faktoren haben zur Folge, dass die Polyploiden ihre diploiden Verwandten häufig aus ihrem ursprünglichen Habitat verdrängen, wodurch diese oft aussterben (Jackson und Hauber 1994, Masterson 1994, Guerra 2008, Jakob und Blattner 2010). Diese Beispiele zeigen,

dass Polyploide ein hohes Anpassungspotential aufweisen um neue ökologischen Nischen zu besetzen (Ramsey und Schemske 1998). Die Genomverdopplung und die darauf folgende Diploidisierung sind eine treibende Kraft für die Adaption sowie die Artenbildung im Pflanzenreich, und stellen somit wichtige Faktoren für die gesamte Evolution und Artenvielfalt dar (Stebbins 1947, Soltis et al. 2009). Die Mechanismen, welche diesen Prozessen zugrunde liegen, sind noch nicht in vollem Umfang erfasst und bis heute nur teilweise verstanden (Wolfe 2001, Baack 2004, Doyle et al. 2008).

1.3 Methoden zur Analyse polyploider Pflanzen

1.3.1 Zytologische Methoden für Untersuchungen von Polyploiden

Eine klassische Methode zur Untersuchung von Polyploiden ist das Anfärben von Chromosomen, Genomabschnitten oder ganzen Genomen. Die Färbung der Chromosomen ist hierbei am einfachsten durchzuführen. Sie können dadurch gut sichtbar gemacht und ausgezählt werden. Abweichungen gegenüber der Chromosomenanzahl eines verwandten diploiden Organismus liefern einen Hinweis darüber, ob das gesamte Genom oder Teile des Genomes gegenüber der diploiden Form aufgedoppelt vorliegen. Die Anfärbung von Chromosomen ermöglicht zudem deren Paarung während der Meiose zu beobachten. Häufig werden Färbungsmethoden und DNA-DNA-Hybridisierungstechniken miteinander kombiniert. Daraus ergeben sich zusätzliche Anwendungsmöglichkeiten, die in Bezug auf die Genomstruktur eines Organismus einen höheren Informationsgehalt bieten. Für die Genomische in situ Hybridisierung (GISH) können potentielle Elter- bzw. Ursprungsgenome mit unterschiedlichen Farbstoffen markiert und gegen das Genom eines hybriden bzw. allopolyploiden Nachkommen hybridisiert werden. Auf diese Weise können die Anteile der Ursprungsgenome solcher Organismen ermittelt und der Anteil der rekombinierten Genomfraktion beider Ursprungsarten dargestellt werden (D'Hont 2005).

Durch das Anfärben eines hoch konservierten DNA-Abschnittes und der anschließenden Hybridisierung gegen ein entsprechendes Genom können Rückschlüsse darüber gezogen werden, wie häufig dieser DNA-Abschnitt in dem

Genom vorhanden ist. Dies ermöglicht die Anzahl der vollzogenen Genomaufdopplungen und die Diversität der daran beteiligten Ursprungsgenotypen zu ermitteln. Dafür wird häufig die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) angewendet. Als Sonde werden dabei oft Abschnitte der Nukleolusorganisorregion (NOR) verwendet, da diese eine der am stärksten konservierte DNA-Region der Eukaryoten darstellt (Hillis und Dixon 1991, Lipscomb et al. 1998). Die Anwendung dieser Technik hat jedoch gezeigt, dass die Anzahl der detektierten NORs nicht zwangsläufig mit der Anzahl der erfolgten Genomaufdopplungen korreliert. Zudem bleiben häufig nicht alle verschiedenen NORs der unterschiedlichen Ursprungsgenotypen eines hybriden oder allopolyploiden Genomes in diesem tatsächlich erhalten (Wendel et al. 1995, Schilling et al. 1998). Stattdessen bleibt zumeist die entsprechende DNA-Sequenz eines Elters erhalten, während die des anderen Elters eliminiert bzw. überschrieben wird (Vanzela et al. 2002, Poczai und Hyvönen 2010).

Eine weitere Methode zur Untersuchung der Ploidiestufe ist die Durchflusszytometrie. Dabei wird die Genomgröße in Pikogramm (pg) gemessen und als Chromatin-Wert (C-Wert) angegeben. Der 1Cx-Wert gibt die Größe des haploiden Chromosomensatzes an. Der 2Cx-Wert bezieht sich auf die Größe des diploiden Chromosomensatzes in Relation zu der zu erwarteten Ploidiestufe. Der 2C-Wert gibt die Größe des gesamten Chromosomensatzes unabhängig von der Ploidiestufe an (Greilhuber et al. 2005). Anhand des 2C-Wertes können die Genomgrößen verschiedener Ploidiestufen einer Gattung miteinander verglichen und in Verhältnis zueinander gesetzt werden. Um die Ploidiestufe eines Organismus auf diese Weise zu ermitteln ist es jedoch notwendig eine zytologisch eindeutig bestimmte Ploidiestufe mit einzubeziehen, um diese in Relation zu den übrigen Ploidiestufen zu setzen.

1.3.2 Molekulare Methoden für Untersuchungen von Polyploiden

Die Methoden für genetische Untersuchungen bei polyploiden Pflanzen basieren größtenteils auf der Anwendung molekularer Marker. Deshalb werden zunächst einige Grundregeln für die Auswertung von Markern bei Polyploiden dargestellt.

Für Polyploide werden molekulare Marker, auch wenn sie kodominant vererbt werden, stets dominant ausgewertet (D'Hont et al. 1994). Da die gängigen Kartierungsprogramme wie JoinMap (Van Ooijen 2006) und Mapmaker (Lander et al. 1987) für diploide Organismen konzipiert wurden, ist die Kodierung und Verrechnung kodominanter Markerdaten für Polyploide anhand dieser Kartierungsprogramme häufig nicht möglich. Dies wird durch die dominante Kodierung der Markerdaten umgangen. Zwar gibt es auch Kartierungsprogramme für Polyploide wie Tetraploidmap (Hackett et al. 2007) und Onemap (Margarido et al. 2007). Jedoch werden für Tetraploidmap Vorkenntnisse über den Ploidietypen sowie die Ploidiestufe benötigt. Onemap hingegen ist nicht ausreichend etabliert. Die dominante Auswertung der Spaltungsdaten erleichtert zudem die Verrechnung dieser Daten durch einige statistische Methoden, die für eine Unterscheidung zwischen den Ploidietypen Allopolyploid und Autopolyploid angewendet werden können. Diese werden im Folgenden vorgestellt.

Für Spaltungsanalysen bei polyploiden Organismen wird unabhängig vom Markertypen zwischen Singeldose (SD)- und Multidose (MD)-Markern unterschieden. Im Falle eines SD-Markers wird ein Locus amplifiziert, an dem sich für den betroffenen Elter lediglich ein dominantes Allel befindet. Durch einen MD-Marker hingegen wird ein Locus detektiert, an dem sich für den betroffenen Elter mehr als ein dominantes Allel befindet. Uniparentale SD-Marker spalten in einer Nachkommenschaft in einem Verhältnis von 1:1, biparentale SD-Marker hingegen in einem Verhältnis von 3:1 (siehe Tabellen 20 und 21 im Anhang). Diese Spaltungsverhältnisse weisen SD-Marker unabhängig vom Ploidietypus und der Ploidiestufe auf. Sie ermöglichen deshalb anhand des Spaltungsverhältnisses keinen Rückschluss auf die genetische Konstitution des Organismus. Die Spaltungsverhältnisse der SD-Marker bei Polyploiden entsprechen denen von diploiden Organismen in einer segregierenden Nachkommenschaft. Deshalb können

ausschließlich diese Marker für die Kartierung von Polyploiden anhand der Kartierungsprogramme JoinMap und Mapmaker verwendet werden.

Im Gegensatz zu SD-Markern können durch MD-Marker unterschiedliche Spaltungsverhältnisse für die verschiedenen Ploidietypen bzw. Ploidiestufen nachgewiesen werden. Jedoch sind die Unterschiede zwischen diesen Spaltungsverhältnissen häufig nicht sehr groß. Deshalb müssten Spaltungsanalysen für Polyploide in sehr großen segregierenden Nachkommenschaften durchgeführt werden, um eine eindeutige Unterscheidung der Spaltungsverhältnisse durch den Chi-Quadrat-Anpassungstest (Pearson 1900) oder entsprechende Bayesianische Ansätze (Olson 1997) zu erreichen.

Eine weitere Methode zur Unterscheidung zwischen den unterschiedlichen Ploidietypen stellt die Ermittlung des Verhältnisses zwischen SD- und MD-Markern dar. Da Silva et al. (1993) haben die theoretische Verteilung von SD-Markern zu MD-Markern für Allopolyploide und Autopolyploide berechnet. Wird das Verhältnis von SD- zu MD-Markern für einen Organismus ermittelt, kann dieses mit den theoretischen Verteilungen für Allo- und Autopolyploide verglichen werden. Auf diese Weise erhält man einen Hinweis auf den Ploidietypus des entsprechenden Organismus.

Ein eindeutiger Indikator für die Bestimmung des Ploidietypus ergibt sich aus den Unterschieden in der meiotischen Chromosomenpaarung zwischen Allo- und Autopolyploiden. Wie unter 1.2 dargestellt, führt die präferentielle Paarung zwischen den homologen Chromosomen bei Allopolyploiden zu einer hohen Frequenz an Bivalenten. Da die beiden beteiligten Homologen anschließend in unterschiedliche Gameten aufgeteilt werden, sind Marker bzw. Merkmale, die auf einem dieser homologen Chromosomen lokalisiert sind, zu denen auf dem entsprechenden anderen homologen Chromosom in der Repulsionsphase gekoppelt. Autopolyploide hingegen weisen eine höhere Anzahl an homologen Chromosomen auf, die während der Meiose miteinander paaren. Dabei besteht für jedes homologe Chromosom die gleiche Wahrscheinlichkeit während der Meiose auf ein bestimmtes anderes homologes Chromosom zu treffen. Welche der homologen Chromosomen in einer solchen Gruppe während der Meiose miteinander paaren und rekombinieren ist deswegen zufällig. Daher hat keiner der homologen Chromosomen einen festen Paarungspartner, der anschließend in einen anderen Gameten überführt wird. Deshalb werden, im Gegensatz zu Allopolyploiden, zwei bestimmte homologe

Chromosomen nicht immer getrennt voneinander vererbt. Aufgrund dessen kann der Grad an Repulsionskopplung zwischen Merkmalen bzw. Markern als Maß für die Unterscheidung zwischen den beiden Ploidietypen Allopolyploid und Autopolyploid herangezogen werden. Dieses kann durch das Verhältnis von Markern, die in der Attraktionsphase gekoppelt sind, zu Markern, die in der Repulsionsphase gekoppelt sind, gemessen werden. Da es bei einer ansteigenden Anzahl an homologen Chromosomen schwieriger wird Repulsionskopplung zwischen Merkmalen bzw. Markern, die auf zwei unterschiedlichen Homologen lokalisiert sind, nachzuweisen, kann das Verhältnis von Attraktionskopplungen zu Repulsionskopplungen zusätzlich einen Hinweis auf die Ploidiestufe liefern (Wu et al. 1992).

Dieser Einfluss der Repulsionskopplung zwischen den homologen Chromosomen kann ebenfalls durch sequenzspezifische Marker, wie beispielsweise Mikrosatellitenmarker, nachvollzogen werden. Anhand solcher Marker kann für einen Genort jeweils ein Allel für jedes homologe bzw. homöologe Chromosom, auf dem die entsprechende Primerbindungsstelle lokalisiert ist, amplifiziert werden. Da unter disomer Vererbung zwei homologe Chromosomen stets in unterschiedliche Gameten gelangen, ist unter diesem Vererbungstypen zu erwarten, dass zwei Allele, die auf den beiden unterschiedlichen homologen Chromosomen eines Subgenomes lokalisiert sind, stets getrennt voneinander vererbt werden. Deshalb erfolgt unter disomer Vererbung keine freie Kombination der entsprechenden parental Allele für einen Locus in einer Nachkommenschaft. Bei polysomer Vererbung hingegen ist mit einer freien Kombination aller Allele, die anhand eines sequenzspezifischen Markers amplifiziert werden, zu erwarten. Deshalb ermöglicht es bereits die visuelle Auswertung der Spaltungsmuster solcher Marker, Rückschlüsse auf den Ploidietypen eines Organismus zu ziehen (Rodzen und May 2002). Sind zudem alle Allele, die durch einen sequenzspezifischen Marker amplifiziert werden, polymorph, entspricht die Anzahl der amplifizierten Banden der Anzahl der homologen bzw. homöologen Chromosomen des betroffenen Organismus. Daher können solche Marker ebenfalls einen Hinweis auf die Ploidiestufe des untersuchten Organismus liefern.

Für viele polyploide Organismen wurde nachgewiesen, dass sie anhand ihrer Charakteristika nicht eindeutig einem Ploidietypus zugeordnet werden können, sondern Mischformen zwischen unterschiedlichen Ploidietypen darstellen (Rodzen und May 2002, Lerceteau-Köhler 2003, Jannoo et al. 2004, Stift et al. 2008).

Deshalb wurden z.B. von Wu et al. (2001), Cao et al. (2004), Jannoo et al. (2004) sowie von Stift et al. (2008) markerbasierte Methoden entwickelt, die ebenfalls eine Charakterisierung von Zwischenformen zwischen den unterschiedlichen Ploidie-typen ermöglichen.

Die Berechnung einer Kopplungskarte auf der Basis molekularer Marker ermöglicht es für Polyploide die Kopplungsgruppen (KGs) in Homöologengruppen einzuteilen. Eine Homöologengruppe umfasst alle einander entsprechenden homologen und homöologen KGs beider Kartierungseltern. Bei der Kartierung werden die Kopplungsphasen der Marker ermittelt. Dadurch kann nachvollzogen werden, in welcher Beziehung die homologen bzw. homöologen Chromosomen zueinander stehen. Auf diese Weise können Rückschlüsse auf den Ploidietypus eines Organismus gezogen werden. Die Anzahl der detektierten homologen bzw. homöologen Chromosomen liefert zudem Informationen über die Ploidiestufe des betroffenen Organismus. Für die Identifizierung von homologen und homöologen Chromsomen können bei der Kartierung sequenzspezifische Marker, SD-Marker, die in der Repulsionsphase gekoppelt sind und MD-Marker genutzt werden (Aitken et al. 2005). Ein Vergleich mit diploiden Verwandten, für die bereits eine Kopplungskarte erstellt wurde, erleichtert zusätzlich die Identifikation der homologen und homöologen KGs anhand sequenzspezifischer Marker (Rousseau-Gueutin et al. 2008).

Die Sequenzierung großer Bereiche des Genomes bzw. ganzer Genome von Pflanzen, wie Beispielweise für *Arabidopsis thaliana* (The *Arabidopsis* Genome Initiative 2000) oder Mais (*Zea mays*; Gaut und Doebley 1997), zeigten, dass weite Bereiche des Genomes dieser Pflanzen dupliziert vorliegen, obwohl sie die Vererbung eines diploiden Organismus aufweisen. Dies deutet darauf, dass diese Pflanzen im Laufe ihrer Entwicklung Genomaufdopplungen vollzogen und anschließend den Prozess der Diploidisierung durchlaufen haben (siehe 1.2). Daher können anhand der Sequenzierung des Genomes eines Organismus Rückschlüsse auf Genomaufdopplungen gezogen werden, die im Laufe seiner Entwicklung stattgefunden haben.

1.4 Hypothesen zur Genomstruktur von *Dahlia variabilis*

Wie bereits unter 1.1.4 dargestellt ist *D. variabilis* ein polyploider Organismus. Jedoch ist nicht eindeutig geklärt, welche Ploidiestufe und welchen Ploidietypus die Gartendahlie sowie die Dahlienwildarten aufweisen.

Sørensen (1969) vermutete, dass die Arten mit $2n = 32$ Chromosomen diploid seien, da dies die niedrigste Ploidiestufe für die Gattung *Dahlia* darstellt. Lawrence (1929) und Darlington (1973) hingegen nahmen an, dass die Arten mit $2n = 32$ Chromosomen tetraploid seien, da der Basischromosomensatz von $x = 16$ für Diploide sehr hoch sei. Daraus folgerte Lawrence (1970), dass der Basischromosomensatz von Dahlien $x = 8$ sei. Gatt et al. (1998) kamen ebenfalls zu dem Rückschluss, dass die Arten mit $2n = 32$ Chromosomen nicht diploid seien, da die hohe Anzahl an NORs (Nukleolusorganisatorregionen, bis zu acht Kopien; siehe 1.1.5) in ihrem Genom darauf deutet, dass diese Wildarten bereits eine Genomaufdopplung vollzogen haben (Gatt et al. 1998). Aufgrund der hohen Frequenz an Bivalenten vermutete Lawrence (1929, 1970), dass die Arten mit $2n = 32$ Chromosomen allotetraploid und deren diploide Vorfahren ausgestorben seien. Gatt et al. (1998) konnten jedoch im Genom dieser Arten keine strukturellen Unterschiede zwischen den Chromosomen nachweisen, wie sie für Allopolyploide zu erwarten wären. Dennoch kamen sie, aufgrund der hohen Frequenz an Bivalenten bei den Arten mit $2n = 32$ Chromosomen, ebenfalls zu dem Schluss, dass diese allotetraploid seien. Wie unter Kapitel 1.1.4 bereits erwähnt, gibt es in einigen Dahlienwildarten sowohl Genotypen mit $2n = 32$ als auch Genotypen mit $2n = 64$ Chromosomen. Aufgrund der hohen Gemeinsamkeit der phänotypischen Merkmale zwischen diesen Genotypen mit unterschiedlichen Chromosomenanzahlen innerhalb einzelner Arten liegt die Schlussfolgerung nahe, dass die Genotypen mit $2n = 64$ autopolyploide Nachkommen der Genotypen mit $2n = 32$ Chromosomen sind (Gatt et al. 1998). Diese Annahme würde auf eine hohe Frequenz an Multivalenten während der Meiose für die Genotypen mit $2n = 64$ Chromosomen schließen lassen. Jedoch bilden die Dahlienwildarten mit $2n = 32$ Chromosomen, die Arten mit $2n = 64$ Chromosomen sowie *D. variabilis* während der Meiose deutlich mehr Bivalente und weniger Multivalente, als dies für einen autopolyploiden Organismus zu erwarten wäre. Aus diesem Grund zogen Gatt et al. (1998) den Schluss, dass Dahlien über

einen Bivalente fördernden Mechanismus verfügen, wie er für allohexaploiden Weizen (*Triticum aestivum*) bekannt ist. Dieser basiert auf einem Gen, das als *Ph1* (Pairing homoeologous 1) bezeichnet wird. *Ph1* unterdrückt die Paarung zwischen den homöologen Chromosomen der unterschiedlichen Subgenome und fördert die Paarung homologer Chromosomen innerhalb der Subgenome in Bivalenten. Bei einer Deletion des entsprechenden Chromosomenabschnittes, auf dem *Ph1* lokalisiert ist, paaren in allopolyploiden Weizenarten homologe und homöologe Chromosomen der verschiedenen Subgenome, bei einer erhöhten Frequenz an Multivalenten, miteinander (Riley und Chapman 1958, Riley et al. 1959).

Anhand der Ergebnisse der Untersuchungen an Dahlien wurden unterschiedliche Hypothesen zur Entstehung von *D. variabilis* entwickelt. Lawrence (1970) führte die hohe Frequenz an Bivalenten darauf zurück, dass im Genom von *D. variabilis* zwei Subgenome vereint seien. Deswegen vermutete er, dass ein Hybrid aus Arten der Klasse 1 und Klasse 2 (siehe 1.1.1) mit $2n = 32$ Chromosomen eine Genomverdopplung vollzogen hat, aus der *D. variabilis* hervorging. Hansen und Hjerting (1996) hingegen vermuteten, dass unterschiedliche Genotypen von *D. coccinea* mit $2n = 64$ Chromosomen und die Wildart *D. sorensenii* ($2n = 64$ Chromosomen) miteinander hybridisierten. Daraus sei die Hybride *D. pinnata* hervorgegangen, die Desfontaines (1829) in *D. variabilis* umbenannt hatte.

Die Methoden, welche bisher für die Untersuchungen bei Dahlien angewendet wurden, führten zu keinem eindeutigen Ergebnis bezüglich der Entstehung von *D. variabilis* sowie den Ploidiestufen und den Ploidietypen der Arten der Gattung *Dahlia*. Daher erscheint eine Untersuchung der Vererbung von *D. variabilis* anhand molekularer Marker sinnvoll. Dies könnte Rückschlüsse auf die Genomstruktur sowie die Entstehung dieser Art zulassen und zusätzliche Kenntnisse für die Entwicklung von Zuchtmethoden für neue Dahliensorten liefern.

1.5 Ziele der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es die Vererbung von *D. variabilis* anhand molekularer Marker zu untersuchen und so Informationen über den Ploidietypus und die Ploidiestufe dieser Art zu erhalten. Aus den daraus resultierenden Erkenntnissen sollten Rückschlüsse auf die Entwicklung von Zuchtstrategien für neue Dahlien-

sorten gezogen werden. Dafür wurden in den Nachkommenschaften K1 und K5 Spaltungsanalysen anhand molekularer Marker durchgeführt.

Außerdem sollte für die Gartendahlie anhand der Population K5 eine genetische Kopplungskarte berechnet werden und Marker-Merkmalsassoziationen zwischen den kartierten Markern und züchterisch relevanten Merkmalen aufgedeckt werden. Auf diese Weise sollten Marker identifiziert werden, die an wichtige phänotypische Merkmale gekoppelt sind.

Alle Wildarten, die an der Entstehung von *D. variabilis* beteiligt sind, stammen wahrscheinlich aus der Sektion *Dahlia* (Lawrence und Scott Moncrieff 1935, Hansen und Hjerting 1996). Daher sollten zusätzlich wirtschaftlich relevante Merkmale aus anderen Sektionen der Gattung *Dahlia* in das Zuchtmaterial der Gartendahlie für die Züchtung neuer Dahliensorten überführt werden. Dafür wurden Kreuzungsversuche zwischen *D. variabilis* und den Wildarten *D. dissecta*, aus der Sektion *Entemophyllon*, sowie *D. macdougallii*, aus der Sektion *Epiphytum*, durchgeführt.

2. Material und Methoden

2.1 Verwendetes Pflanzenmaterial

Für die molekularen Untersuchungen wurden verschiedene Dahliensorten, Dahlienwildarten und die beiden Gartendahlien-Populationen K1 und K5 verwendet. Das Pflanzenmaterial wurde an der Leibniz Universität Hannover in den Jahren 2007 bis 2011 im Sommer im Freiland ausgepflanzt. Im Winter wurden alle Sorten sowie die beiden untersuchten Populationen als Knollen eingelagert. Die Dahlienwildarten hingegen wurden im Gewächshaus in Töpfen in TS1-Substrat (Klasmann/Deilmann GmbH) als Pflanzen überwintert.

Bei der Testung einiger Mikrosatellitenmarker wurden die Eltern und zwei Nachkommen der *Helianthus annuus*-Population RHA280 x RHA801 (<http://www.uga.edu/>) miteinbezogen. Alle für die molekularen Analysen verwendeten Genotypen sind in der Tabelle 19 im Anhang aufgelistet.

2.1.1 Dahliensorten

Für die Erzeugung der spaltenden Nachkommenschaft K5 wurden die Dahliensorten Karneol und Nordlicht aus dem Sortiment des Dahlienzüchters Professor M. Otto aus Lüneburg genutzt. Außerdem wurde die Sorte Roxy (A. Lorenzen, Hamburg, Deutschland) aus der Sammlung der Leibniz Universität Hannover für Kreuzungen zwischen Gartendahlien und den Wildarten *D. dissecta* und *D. macdougallii* genutzt.

2.1.2 Dahlienwildarten

Die verwendeten Wildarten *D. coccinea* (W 124), *D. excelsa*, *D. imperialis*, *D. macdougallii* und *D. merckii* sowie die Wildhybride *D. pinnata* stammen aus der Sammlung der Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen (BAZ) in Ahrensburg und sind nach dessen Auflösung in die Sammlung der Leibniz Universität Hannover übergegangen.

Die Wildarten *D. coccinea* (BKGP), *D. rudis* und *D. tubulata* wurden von der Gärtnerei Panzer und dem Dahlienzentrum in Bad Köstritz zu Verfügung gestellt. Diese stammen aus der Dahliensammlung des Botanischen Gartens in Kopen-

hagen, und waren zuvor von verschiedenen Botanikern aus Mexiko eingeführt worden (Hansen und Hjerting 2000). Letztlich wurden zusätzlich die Wildarten *D. australis*, *D. coccinea* und *D. brevis* aus dem Botanischen Garten in Kopenhagen beschafft.

2.1.3 Populationen

Für die molekularen Analysen wurden die Populationen K1 und K5 verwendet. Die Population K1 umfasst 130 Nachkommen. Sie stammt aus Kreuzungen zwischen der Topfdahlie T8, aus der Sammlung der Leibniz Universität Hannover als Mutter, und der Gartendahlie M 331-6 aus der Sammlung des Züchters Professor M. Otto als Vater. Die Kreuzungen für diese Population wurden größtenteils von H. Wegner und der Firma Selekt/Klemm über mehrere Jahre durchgeführt. Die Population K1 wurde anhand der entwickelten Mikrosatellitenmarker untersucht.

Die Population K5, die aus einer Kreuzung zwischen den Gartendahliesorten Karneol als Mutter und Nordlicht als Vater hervorging, umfasst insgesamt 288 Nachkommen. Die Ausgangssorten stammen aus dem Zuchtprogramm von Professor M. Otto. Um Karneol und Nordlicht zu kreuzen, wurden jeweils einige Pflanzen dieser Sorten gemeinsam in einer Isolierungspartelle zur Abblüte gebracht. Die so erzeugte Population K5 wurde mithilfe von AFLP[®]- und Mikrosatellitenmarkern untersucht. Anhand der Markerspaltungsdaten wurde für diese Population außerdem eine Kopplungskarte berechnet.

Von den insgesamt 288 Nachkommen wurden zunächst 188 Nachkommen in die molekularen Analysen einbezogen. Davon wurden jedoch 15 Genotypen ausgeschlossen, da die AFLP[®]- bzw. Mikrosatellitenmarker zeigten, dass diese eindeutig auf Fremdbestäubungen zurückzuführen sind. Daher wurden die Kartierung und die Markeranalysen auf der Basis von 173 Nachkommen durchgeführt. Die Genotypen, die aufgrund von Fremdbestäubungen ausgeschlossen wurden, sind in Tabelle 22 im Anhang aufgelistet.

2.2 Kreuzungsversuche

Um neue Merkmale aus Dahlienwildarten in das Zuchtmaterial für *D. variabilis* zu überführen, wurde versucht die Wildarten *D. dissecta* sowie *D. macdougalii* mit der

Gartendahlie zu kreuzen. Dafür wurde stets der Pollen einer Pflanze mit einem Pinsel (Pelikan Pinsel Goldstar S 57/6) von der Blüte herunter gestrichen und gesammelt. Anschließend wurde der Pollen auf die Blüte einer anderen Art aufgebracht. Um Fremdbestäubungen zu verhindern wurden die Blüten danach mit perforierten Polyethylenbeuteln isoliert.

Die Wildart *D. dissecta* wurde außerdem auf einem Feld zusammen mit dem Sortiment von Professor M. Otto sowie einigen Wildarten zur freien Abblüte gebracht, um eine Bestäubung dieser Wildart durch Insekten zu ermöglichen.

2.3 Erhebung phänotypischer Merkmale

Um Assoziationen zwischen den angewendeten Markern und züchterisch relevanten Merkmalen aufzudecken, sowie für die Kartierung von QTLs wurden für die Population K5 an zwei unterschiedlichen Standorten im Freiland Daten für 22 phänotypische Merkmale erhoben. Die Merkmale wurden 2009 (Umwelt 1) und 2010 (Umwelt 2) in Herrenhausen und 2010 auf dem Versuchsgelände der Leibniz Universität Hannover in Ruthe (Umwelt 3) gemessen. Die Daten wurden von M. Stümper (Umwelt 1 und 2) und R. Chaudhary (Umwelt 3) erhoben. Die Messung der Blütenstiellänge, des Blütenstandsdurchmessers und der Anzahl der Blütenblätter erfolgten jeweils an zehn Blütenständen. Die Merkmale der Zungenblüte wurden jeweils an vier Zungenblüten von drei verschiedenen Blütenständen gemessen. Die Blattgröße sowie die Blattfiederung wurden jeweils am fünften Blatt unterhalb eines Blütenstandes bestimmt. Eine Übersicht über alle gemessenen phänotypischen Merkmale gibt die Tabelle 2.

Tabelle 2: Phänotypische Merkmale, die in der Population K5 erhoben wurden

Merkmal	Datentyp	Ausprägung
Blütenstängellänge	nominal	6 bis 50 cm
Blütenstandsdurchmesser	nominal	3,5 bis 14,5 cm
Blütenfarbenmusterung	ordinal	verlaufend, zoniert, mosaik
Blütenfarbenverteilung	ordinal	einfarbig, zweifarbig, dreifarbig
Blütenfarbe	ordinal	weiß, gelb, rot, violett
Blütenfarbenintensität	nominal	Klassen 1 bis 3
Blütenfarbenanteil	nominal	1/9 bis 7/8
Tellerfarbe	ordinal	gelb, gelb dunkel, dunkel, ganz dunkel
Spreublattfarbe	ordinal	grün, rot
Blütenröhrenfarbe	ordinal	grün, rot
Zungenblütenlänge	nominal	2,5 bis 7 cm
Zungenblütenbreite	nominal	1,5 bis 4 cm
Zungenblütenrandform	ordinal	rund, oval, spitz, gezackt
Zungenblütenfaltung	ordinal	nach hinten, ohne, nach vorn
Anzahl Blütenblätter	nominal	6 bis 26
Laubfarbe	ordinal	grün: hell, mittel, dunkel; violett: hell, mittel, dunkel
Blattlänge	nominal	6,5 bis 22 cm
Blattbreite	nominal	7 bis 23 cm
Blatffiederung	ordinal	ohne, einfach, doppelt, mehrfach
Gesamtpflanzenhöhe	nominal	30 bis 137 cm
Blühwilligkeit	ordinal	0 bis 3
Blütenstängelfarbe	ordinal	grün, violett

2.4 Zytologische Methoden

Für einige Kreuzungsnachkommen und deren Eltern wurden die Genomgrößen anhand von Durchflusszytometrie bestimmt.

Die Durchflusszytometrie wurde am CyFlow[®] Ploidy Analyzer (Partec GmbH) der Abteilung Baumschule des Institutes für Zierpflanzen- und Gehölzwissenschaften der Leibniz Universität Hannover durchgeführt. Zur Anfärbung der Zellkerne wurde Propidiumiodid verwendet. Die Blätter wurden zwei bis drei Stunden vor den Analysen frisch geerntet und in Plastikbehältern auf angefeuchtetem Haushaltspapier gelagert. Um gleichmäßige Peaks zu erhalten, wurden die Blattproben mit einem Korkbohrer (1,5 cm Durchmesser) aus den Blättern gestochen. Die Aufbereitung der Proben erfolgte durch das CyStain[®] PI Absolute P-Kit nach den Angaben des Herstellers. Nach der Aufbereitung der Proben wurden diese ca. eine Stunde im Dunkeln auf Eis gelagert, bis die Messungen durchgeführt

wurden. Die Fließgeschwindigkeit wurde für die Messungen auf 0,4 µl pro Sekunde eingestellt. Für jeden Genotypen wurden mindestens 2000 Partikel gemessen. Zunächst wurden die Proben für die Eltern einzeln und anschließend gemeinsam aufbereitet und gemessen. Dabei wurde eine Verstärkungsintensität (Gain) von 730 eingestellt. Anschließend wurden die Eltern jeweils gemeinsam mit jedem einzelnen Nachkommen untersucht, um zu überprüfen, ob sie abweichende Ploidiestufen gegenüber den Kreuzungseltern aufweisen. Für die Bestimmung der 2C-Werte wurde schließlich jeder einzelne Genotyp noch einmal gemeinsam mit einer Tomate (*Lycopersicon esculentum*, Sorte Stupicke Polni Rane; 2C = 1,96 pg; Doležl et al. 1992) als Referenz gemessen, um die ermittelten Werte zu denen der Tomate in Relation zu setzen. Dabei wurde der Gainwert auf 600 erniedrigt.

2.5 Molekulare Methoden

Die meisten Untersuchungen, die in den beiden Populationen K1 und K5 durchgeführt wurden, basieren auf molekularen Markern. Da bisher noch keine Marker für Dahlien veröffentlicht waren, mussten zunächst Mikrosatellitenmarker für diese entwickelt werden. Außerdem wurde die AFLP[®]-Technik für die Anwendung in der Population K5 optimiert.

2.5.1 DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktionen wurden mit DNA-Mini-Preparationskits Nucleo Spin 2-Kit von Macherei und Nagel und dem DNA easy Plant Maxi Kit von Qiagen durchgeführt. Dafür wurden 65 bis 70 mg Blattmaterial eingewogen und anschließend 24 Stunden bei 37 °C im Dunkeln auf Silikagel getrocknet. Danach wurde das Blattmaterial bei -20 °C eingefroren.

Die DNA-Extraktion erfolgte jeweils nach dem entsprechenden Herstellerprotokoll. Lediglich für das Nucleo Spin 2-Kit von Macherei und Nagel wurde eine Modifikation durchgeführt. Die getrockneten und gefrorenen Blattproben wurden vor dem Zellaufschluss in der Schwingmühle (3 min bei 30 Schwingungen pro Sekunde) in flüssigem Stickstoff gekühlt, so dass sie nicht auftauen konnten, bis das zerkleinerte Blattmaterial in den Puffer PL1 des DNA-Isolierungskits aufgenommen wurde.

Für einzelne Versuche wurde eine Maxi DNA-Isolierung nach Kobayaschi (Kobayaschi et al. 1998) durchgeführt. Dafür wurden 2 g frisches, mit flüssigem Stickstoff im Mörser zerkleinertes, Pflanzenmaterial eingesetzt.

Zur Quantifizierung der DNA wurde 1 µl DNA-Lösung mit 9 µl bidestilliertem Wasser gemischt und zusammen mit einer Standardreihe (20, 40, 60, 80, 100 ng) λ-DNA (Invitrogen) auf einem 1%igem Agarosegel aufgetragen. Die Intensität der Banden wurde anschließend mit dem Programm GelProAnalyzer (Media Cybernetics) ermittelt. Anhand der Standardreihe wurden die DNA-Konzentrationen bestimmt. Schließlich wurden die DNA-Arbeitslösungen auf eine Konzentration von 5 ng/µl eingestellt.

2.5.2 Transfer von Mikrosatellitenmarkern aus anderen Gattungen

Um Mikrosatellitenmarker für die Gartendahlie zu erhalten, wurde zunächst versucht Marker, die bereits für andere Gattungen der Familie der *Asteraceae* angewendet wurden, für Dahlien zu amplifizieren. Dafür wurden Marker genutzt, deren Transferierbarkeit zwischen anderen Gattungen innerhalb dieser Familie bereits bekannt war. Heesacker et al. (2008) entwickelten Mikrosatellitenmarker aus Expressed Sequence Tags (ESTs) und wendeten diese bei verschiedenen Arten der Gattungen *Helianthus*, *Lactuca* und *Carthamus* an. Es wurden hauptsächlich Marker auf die Nutzbarkeit bei Dahlien getestet, die von den Autoren für alle drei Gattungen amplifiziert werden konnten. Die Anwendung der Marker erfolgte unter den Bedingungen nach Heesacker et al. (2008). Als Positivkontrolle dienten die Eltern und zwei Nachkommen der Sonnenblumenpopulation RHA280 x RHA801 (<http://www.uga.edu/>).

2.5.3 Anreicherung einer DNA-Bank auf Mikrosatellitenmotive

Nachdem versucht wurde Mikrosatellitenmarker aus anderen Gattungen bei *D. variabilis* anzuwenden, wurde zusätzlich eine auf Mikrosatelliten-Motive angereicherte DNA-Bank erzeugt, um spezifische Primer für Mikrosatellitenmarker herzustellen.

Die Entwicklung von Mikrosatelliten-Primern anhand einer angereicherten DNA-Bank erfolgte in Kooperation mit der Abteilung für Systematik und Morphologie der Pflanze vom Institut für Biologie der Universität Kassel. Die Anreicherung auf Mikrosatelliten-Motive wurde zunächst in Kassel durchgeführt, die anschließende Verarbeitung der Fragmente erfolgte in Hannover.

Außer für *D. variabilis* wurden zusätzlich Mikrosatellitenmarker für *Aster*, *Spergularia*, *Suaeda*, *Euphorbia* und *Macaranga* entwickelt. Die Mikrosatellitenanreicherung wurde nach Fischer und Bachmann (1998) durchgeführt. Die Abweichungen vom Originalprotokoll sind in Prinz et al. (2009) im Detail beschrieben. Dabei wurden zwei unterschiedliche Anreicherungsansätze durchgeführt. Im ersten Ansatz erfolgte eine Anreicherung auf das Motiv (GA)₁₂. Im zweiten Ansatz wurde eine Anreicherung auf einen Oligonukleotid-Mix mit den Motiven (CAA)₈, (CAG)₈ und (GT)₁₂ durchgeführt. Nach zwei Anreicherungsrounds wurden die DNA Fragmente in das pGEM-T Easy Vector System I (Promega) ligiert und in kompetente *E. coli* DH10B-Zellen (Invitrogen) transformiert. Anschließend wurden die Bakterienkolonien auf Nylonfilter übertragen und durch DNA-DNA-Hybridisierung anhand radioaktiv (P-32) markierter Oligonukleotide mit dem jeweils entsprechenden Mikrosatellitenmotiv hybridisiert. Die Kolonien, welche starke Signale aufwiesen, wurden anschließend zum Sequenzieren an die Firma GATC Biotech geschickt. Für die erhaltenen Sequenzen wurden anhand der Internet-homepage Primer3 (<http://primer3.sourceforge.net/>, Rozen und Skaletsky 2000) spezifische Primer entwickelt.

2.5.4 Screening von 454-Sequenzen auf Mikrosatellitenmotive

Letztlich wurden außerdem die Sequenzen eines 454-Sequenzierungsansatz bei *D. variabilis* genutzt um Mikrosatellitenmarker für Dahlien zu entwickeln. Für die 454-Sequenzierung wurden zunächst Randomly amplified polymorphic DNA-Marker (RAPD-Marker; Williams et al. 1990) für die Kartierungseltern Nordlicht und Karneol amplifiziert. Anschließend fand eine Selektion von RAPD-Primern statt, die klare polymorphe Amplifikate in einem Größenbereich zwischen 500 und 1000 bp amplifizierten. Danach wurden die PCR-Ansätze von 15 RAPD-Reaktionen mit unterschiedlichen Primern (siehe Tabelle 24 im Anhang) für die Kartierungsmutter

Karneol gepoolt. Die Amplifikate der gepoolten PCR-Ansätze wurden mit 10 % Natrium Acetat (3M) gefällt und in bidestilliertem Wasser auf die, für die Sequenzierung erforderliche Konzentration von 150 ng/µl eingestellt. Schließlich wurde die DNA-Lösung zum Sequenzieren zu der Firma GATC Biotech eingeschickt.

An den erhaltenen Sequenzen erfolgte ein Screening auf repetitive Motive anhand der Software Tandem repeats finder (Benson 1999). Dabei wurden folgende Parameter eingestellt: Alignment Parameter: 2, 7, 7; Minimum Alignment Score: 30; Maximum Period size: 50. Für die identifizierten repetitiven Sequenzabschnitte wurden mit der Internethomepage Primer3 (<http://primer3.sourceforge.net/>, Rozen und Skaletsky 2000) Primerpaare entwickelt. Die verwendeten 454-Sequenzen sind auf der CD im Anhang beigelegt.

2.5.5 Testung und Anwendung der Mikrosatelliten-Primerpaare

Um zu testen, ob anhand der entwickelten Mikrosatelliten-Primerpaare spezifische Produkte amplifiziert werden konnten, wurden die Amplifikate zunächst auf 1%igen Agarosegelen aufgetrennt. Die Primerpaare, die diskrete Banden erzeugten, wurden anschließend durch eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese auf Polymorphismen zwischen den Eltern der Populationen K1 und K5 überprüft. Die Markierung der erstellten Mikrosatelliten-Primerpaare erfolgte nach der Methode von Schuelke (2000). Dabei wird der Vorwärtsprimer eines jeden Primerpaares an seinem 5' Ende mit einer dem Universal-Primer (M13 universal Primer) homologen Adaptersequenz (5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3') versehen. Diese Sequenz dient als Anlagerungsstelle für den IRD 700 markierten M13-Universal-Primer.

Die Mikrosatellitenprimer wurden von der Firma Eurofins MWG Operon synthetisiert. Der Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 25 µl wurde aus folgenden Komponenten angesetzt: 20 ng DNA, 1/5 Vol. 10x Williams Puffer, 0,16 mM dNTPs, 0,06 µM Vorwärtsprimer, 0,2 µM Rückwärtsprimer, 0,07 µM M13-Primer (IRD700 markiert) und 0,7 U Taq-Polymerase (Bioline).

Die PCR wurde mit 25 Zyklen bei einem Anlagerungs-Temperaturgradienten in 5°C-Schritten zwischen 50 und 60°C durchgeführt. Darauf folgten 8 Zyklen mit der Anla-

gerungstemperatur für den IRD 700 markierten M13-Primer bei 52 °C. Die Reaktionsbedingungen sind in der nachfolgenden Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Reaktionsbedingungen für die M13 Mikrosatelliten-PCR

Anzahl der Zyklen	Reaktionsschritt	Dauer in min	Temperatur in °C
1	Anfangsdenaturierung	10	94
25	Denaturierung	0,5	94
	Hybridisierung	0,5	50-60 ¹
	Synthese	0,5	72
8	Denaturierung	0,5	94
	Hybridisierung	0,75	52
	Synthese	1	72
1	Endsynthese	10	72

1 = die Synthesetemperaturen für die unterschiedlichen Marker sind in Tabelle 32 im Anhang aufgelistet

Die so entwickelten Mikrosatellitenmarker wurden für Spaltungsanalysen in den Populationen K1 und K5 angewendet.

2.5.6 Anwendung der AFLP®-Technik

Die AFLP®-Technik wurde nach einem modifiziertem Protokoll von Vos et al. (1995) durchgeführt. Dabei wurden 200 ng Gesamt-DNA mit 5 U *Hind*III sowie 3 U *Mse*I und 1/10 Vol. RL-Puffer, in einem Gesamtvolumen von 25 µl, über Nacht bei 37°C verdaut. An die Enden der so erzeugten DNA-Fragmente wurden die Schnittstellen-spezifischen Adapter für *Hind*III und *Mse*I ligiert. Dazu wurde dem Restriktionsansatz ein Ligationsgemisch (0,5 µM *Hind*III-Adapter, 0,5 µM *Mse*I-Adapter, 1/10 Vol. 10x RL-Puffer, 0,25 U T4-DNA-Ligase) in einem Gesamtvolumen von 5 µl zugegeben. Anschließend wurde der Ansatz für 4,5 Stunden bei 37 °C inkubiert. In der sich daran anschließenden Präamplifikation wurden 5 µl Ligationsansatz zusammen mit jeweils 75 ng Präamplifikationsprimer (*Hind*III+A und *Mse*I+A), 0,2 mM dNTPs, 1/10 Vol. 10x Williams Puffer und 5 U Taq-Polymerase (Bioline) in einem Gesamtvolumen von 50 µl eingesetzt. Die Reaktionsbedingungen für die Präamplifikation sind in der nachfolgenden Tabelle 4 aufgelistet. Die verwendeten Primer- und Adaptersequenzen sind im Anhang in den Tabellen 26 und 27 aufgeführt.

Tabelle 4: PCR Reaktionsbedingungen für die AFLP®-Präamplifikation

Anzahl der Zyklen	Reaktionsschritt	Dauer in min	Temperatur in °C
1	Anfangsdenaturierung	5	94
20	Denaturierung	0,5	94
	Hybridisierung	0,5	60
	Synthese	1	72
1	Endsythese	10	72

Die selektive Amplifikation wurde in einem Gesamtvolumen von 11 µl mit folgenden Reagenzien durchgeführt: 2,5 µl des Präamplifikationsansatzes (1:20 in 1xTE-Puffer verdünnt), 4 ng *Hind*III-Primer (IRD 700 markiert), 4 ng *Hind*III-Primer (IRD 800 markiert), 15 ng *Mse*I-Primer, 0,2 µM dNTPs, 0,25 U Taq Polymerase, 1/10 Vol. 10x Williams Puffer. Dabei wurden stets sowohl *Hind*III- als auch *Mse*I-Primer mit vier selektiven Basen verwendet. Die PCR-Reaktionsbedingungen für die selektive Amplifikation sind in der nachfolgenden Tabelle 5 aufgeführt. Die verwendeten AFLP®-Primersequenzen sind im Anhang in den Tabellen 28 und 29 aufgelistet.

Tabelle 5: PCR Reaktionsbedingungen für die AFLP®-Endreaktion

Anzahl der Zyklen	Reaktionsschritt	Dauer in min	Temperatur in °C
1	Anfangsdenaturierung	5	94
1	Denaturierung	0,5	94
	Hybridisierung	0,5	65
	Synthese	1	72
11	Denaturierung	0,5	94
	Hybridisierung	0,5	65-0,7 pro Zyklus
	Synthese	1	72
11	Denaturierung	0,5	94
	Hybridisierung	0,5	56
	Synthese	1	72
1	Endsythese	10	72

Die *Hind*III-Primer waren jeweils an ihrem 5'-Ende mit einem Fluoreszenz-Farbstoff markiert, dessen Absorptionsmaximum entweder 795nm (IRD 800) oder 685nm (IRD 700) beträgt (LICOR-Sequencing Manual 1999). Die AFLP®-Marker wurden ausschließlich in der Population K5 angewendet. Die Optimierung der AFLP®-Technik für diese Population wurde zum Teil von H. Wegner durchgeführt.

2.5.7 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung und Detektion der IRD 700- und IRD 800-markierten Amplifikate der AFLP[®]- und Mikrosatellitenmarker erfolgte durch die Polyacrylamid-Gelelektrophorese am 4200 oder 4300 Doppellaser-Sequenzsystem von LiCor[®] Bioscience. Für die Visualisierung der IRD-markierten Amplifikate wurde die Software e-Seq V2.0 oder e-Seq V3.0 verwendet. Als Matrix wurde ein 6%iges denaturierendes Polyacrylamidgel (SequaGel[™]XR, Biozym Scientific GmbH) genutzt. Es wurden Gele mit einer Länge von 18 oder 25 cm und einer Dicke von 0,25 mm oder 0,2 mm verwendet. Zuvor wurden die Proben je nach Intensität der Signalstärke mit einer entsprechenden Menge Ladepuffer (siehe Tabelle 30 im Anhang) versetzt. Die Auftrennung der amplifizierten Fragmente erfolgte bei 1500 V, 35 mA und 35 W bei einer Temperatur von 45°C. Die Gelbilder wurden ausgedruckt oder direkt am Monitor ausgewertet. Für die Bestimmung der Fragmentgrößen wurden die IRD 700 bzw. IRD 800 markierte Größenstandarts 50-350 Size Standard und 50-700 Size Standard von Licor verwendet.

2.6 Statistische Methoden

2.6.1 Berechnung des Verhältnisses von Singledosemarkern zu Multidosemarkern

Da Silva et al. (1993) haben für die beiden Ploidietypen Allo- und Autopolyploid folgende theoretischen Verhältnisse von Singledose-Markern (SD-Marker) zu Multidose-Markern (MD-Marker) berechnet:

Allopolyploide: 0,56 zu 0,44

Autopolyploide: 0,7 zu 0,3

Anhand des geometrischen Mittels wurde der Selektionspunkt für uniparentale SD-Marker zwischen der 1:1 und der 3:1 Verteilung bestimmt (siehe Formel 2.1; Mather 1957). Dieser stellt den Mittelwert zwischen dem zu erwartenden Spaltungsverhältnis für uniparentale SD-Marker und dem Spaltungsverhältnis für uniparentale

MD-Marker für die niedrigste Dosenanzahl (Duplexmarker, siehe Tabellen 20 und 21 im Anhang) dar.

Geometrisches Mittel: $(a \times b)^{1/2} = \sqrt{a \times b}$

$$\sqrt{\frac{3}{1} \times \frac{1}{1}} = 1,73 \quad 2.1$$

Für die Selektion der biparentalen SD-Marker wurde das geometrische Mittel zwischen den Verteilungen 3:1 und 15:1 nach der Formel 2.2 ermittelt (Mather 1957, Grivet et al. 1996).

$$\sqrt{\frac{15}{1} \times \frac{3}{1}} = 6,71 \quad 2.2$$

Zunächst wurde anhand der AFLP[®]- und Mikrosatellitenmarker für die Kartierungspopulation K5 mit Excel 2002 SP3 (Microsoft) eine 1/0 Matrix erstellt. In dieser Markerdatenmatrix wurde für alle Marker die Anzahl der Individuen, welche die entsprechende elterliche Bande aufwiesen, durch die Anzahl der Individuen, welche die entsprechende elterliche Bande nicht aufwiesen, dividiert. Lag dieser Wert unter dem für uniparentale bzw. biparentale Marker ermittelten Selektionspunkt, wurde der Marker als SD-Marker klassifiziert. Wenn der errechnete Wert den Selektionspunkt überschritt, wurde der Marker als MD-Marker klassifiziert.

2.6.2 Bestimmung des Verhältnisses von Attraktionskopplungen zu Repulsionskopplungen

Wu et al. (1992) haben folgende Verhältnisse für Marker, die in der Attraktionsphase gekoppelt sind, zu Markern, die in der Repulsionsphase gekoppelt sind, für die unterschiedlichen Ploidietypen bzw. Ploidiestufen berechnet:

Allopolyploid: 1:1

Autotetraploid: 1:0,25

Autopolyploid für höhere Ploidiestufen: 1:0

Für die Ermittlung des Verhältnisses von Attraktionskopplungen zu Repulsionskopplungen wurden die Spaltungsdaten der zuvor selektierten uniparentalen SD-Marker genutzt (siehe 2.6.1). Anhand dieser Marker wurde für die Eltern der Population K5 jeweils eine Kopplungskarte bei einer Rekombinationsfrequenz von 0,35 berechnet. Dies erfolgte durch die Kartierungssoftware JoinMap Version 4 (Van Ooijen 2006) im Backcross1-Modus (BC1-Modus) für 75 Nachkommen (Wu et al. 1992). Die Gruppierung der Marker in unterschiedliche Kopplungsgruppen (KGs) erfolgte auf Basis des „independence LOD“-Wertes. Die KGs wurden jeweils bei LOD-Werten in einer Spanne von 6 bis 10 berechnet, für die sich die Marker stabil in unterschiedliche KGs auftrennten. Die Distanzen der Marker wurden für die einzelnen KGs anhand der Kosambi Kartierungsfunktion (Kosambi 1994) berechnet. Für die übrigen Parameter wurden die voreingestellten Werte verwendet. Anschließend wurden die Daten dieser Marker aus der erstellten 1/0 Markerdatenmatrix kopiert und invertiert. Dafür wurden in dem kopierten Datensatz für alle Nachkommen die Einsen in Nullen und alle Nullen in Einsen kodiert. Die Marker des invertierten Datensatzes wurden mit einem „R“ am Ende ihrer Bezeichnung gekennzeichnet. Diese Marker wurden in die zuvor berechnete Karte integriert. Danach wurden alle Kopplungen zwischen den Markern, sowohl innerhalb des originalen Datensatzes als auch zwischen den Markern des originalen Datensatzes und des invertierten Datensatzes, ermittelt. Kopplungen innerhalb des Originaldatensatzes wurden als Attraktionskopplungen angenommen, während Kopplungen zwischen dem originalen und dem invertierten Datensatz als Repulsionskopplungen klassifiziert wurden (Ukoskit und Thompson 1997, Kriegner

et al. 2003). Die Werte wurden für die beiden Kartierungseltern Nordlicht und Karneol getrennt erhoben und später addiert. Anschließend wurden die so ermittelten Daten anhand des Chi-Quadrat-Anpassungstests (Pearson 1900) auf die theoretischen Verhältnisse von Attraktionskopplungen zu Repulsionskopplungen für Allopolyploide, Autotetraploide und Autopolyploide höherer Ploidiestufen überprüft.

2.6.3 Berechnung der Kopplungskarten

Da die Gartendahlie ein polyploider Organismus ist, dessen Ploidietypus und Ploidiestufe unbekannt sind, wurde ein Kartierungsprozess in mehreren unterschiedlichen Schritten durchgeführt (Rousseau-Gueutin et al. 2008). Für die Berechnung der genetischen Kopplungskarte wurde anhand der Software JoinMap Version 4 (Van Ooijen 2006) nach folgendem Schema vorgegangen:

1. Selektion der SD-Marker für die Population K5 (siehe 2.6.1).
2. Berechnung separater Karten für die Eltern Karneol und Nordlicht anhand der selektierten SD-Marker (siehe 2.6.2) im Cross Pollination-Modus (CP-Modus).
3. Identifizierung der homologen bzw. homöologen KGs anhand von Mikrosatellitenmarkern.
4. Verbindung der beiden berechneten elterlichen Karten durch biparentale AFLP[®]-Singledosemarker; Identifizierung weiterer homologer KGs.
5. Integration von Multidosemarkern und Identifizierung zusätzlicher homologer bzw. homöologer KGs.
6. Identifizierung von Marker-Merkmalsassoziationen und Kartierung von Quantitative Trait Loci (QTLs).

Die Berechnung der genetischen Kopplungskarte wurde im CP-Modus, bei den gleichen Parametern wie unter 2.6.2 beschrieben, durchgeführt. Die Darstellung der KGs erfolgte in Powerpoint 2002 SP3 (Microsoft). Die Verknüpfung der Mikrosatellitenmarker und der biparentalen AFLP[®]-Marker wurde manuell durchgeführt. Die LOD-Werte, bei denen die KGs berechnet wurden, sind im Anhang in den Tabellen 34 und 35 aufgelistet.

Die Genomgröße und die Genomabdeckung anhand der kartierten Marker wurde nach Chakravarti et al. (2001) und Stein et al. (2007) nach den folgend aufgeführten Formeln 2.3 und 2.4 berechnet.

$$E(G) = \frac{n(n-1)d}{k} \quad 2.3$$

$E(G)$ ist die berechnete Genomgröße für den jeweiligen Kartierungselter. Dabei stellt n die Anzahl der kartierten Marker dar, d ist die maximale Distanz in cM zwischen zwei Markern und k gibt die Anzahl der Markerpaare an zwischen denen eine Kopplung nachgewiesen werden konnte.

$$E(C) = \frac{l \times 100}{E(G)} \quad 2.4$$

$E(C)$ stellt die berechnete Abdeckung des Genoms anhand der kartierten Marker in der erstellten genetischen Kopplungskarte dar, wobei l die Kartenlänge ist.

2.6.3.1 Einteilung der Kopplungsgruppen in Homöologengruppen

Die KGs, die zuvor auf Basis der SD-Marker berechnet wurden, wurden anschließend anhand der Mikrosatelliten- und biparentalen AFLP[®]-Marker in Homöologengruppen unterteilt. Dabei wurden zuerst alle KGs, auf denen die unterschiedlichen Allele eines Mikrosatellitenmarkers kartiert wurden, in einer Gruppe zusammengefasst. Anschließend wurden die biparentalen AFLP[®]-Singledosemarker, die auf diesen KGs lokalisiert waren, mit den entsprechenden Markern, die für den anderen Elter kartiert wurden, verbunden. Diese KGs wurden ebenfalls den jeweiligen Homöologengruppen hinzugefügt. Um diesen weitere homologe bzw. homöologe KGs zuzuordnen, wurde anschließend versucht uniparentale 3:1 spaltende MD-Marker zu kartieren.

Dafür wurden die SD-Marker jeder einzelnen KG ausgewählt und anhand der Kartierungssoftware JoinMap Version 4 (Van Ooijen 2006) auf Kopplung an die MD-Marker untersucht (Kriegner et al. 2003). Dabei wurden ausschließlich die Kopplungen zwischen SD- und MD-Markern angenommen, nicht jedoch Kopplungen

innerhalb der MD-Marker. Wenn ein MD-Marker auf zwei KGs kartiert werden konnte, sollten diese KGs in eine Homöologengruppe zusammengefasst werden. War hingegen eine dieser beiden KGs bereits einer Homöologengruppe zugeordnet, sollte die entsprechende zweite KG dieser Gruppe hinzugefügt werden.

Dabei wurden die gleichen Parameter, wie unter 2.6.3 aufgeführt, eingestellt. Lediglich die Rekombinationsfrequenz wurde auf 0,25 erniedrigt.

2.6.4 Marker- Merkmalsassoziationen

Um Korrelationen zwischen den kartierten Markern und den phänotypischen Merkmalen, die für die Population K5 erhoben wurden, aufzudecken, wurden ein *Kruskal-Wallis*-Test sowie ein Permutationstest und ein Interval Mapping anhand der Software MapQTL 6 (Van Ooijen 2009) durchgeführt.

Anhand des *Kruskal-Wallis*-Tests werden die einzelnen Marker auf Assoziationen an bestimmte Merkmale untersucht. Im Gegensatz dazu werden beim Interval Mapping zusätzlich die Regionen zwischen den Markern auf Korrelationen an die erhobenen Merkmale überprüft. Durch den Permutationstest wurden für die verschiedenen KGs die LOD-Werte ermittelt, ab denen die Ergebnisse des darauf folgenden Interval Mappings als signifikant angenommen werden konnten. Der Permutationstest wurde bei den voreingestellten Standardparametern durchgeführt, lediglich die Anzahl der Permutationen wurde auf 1000 erniedrigt. Beim anschließenden Interval Mapping wurden für die unterschiedlichen KGs die durch den Permutationstest ermittelten LOD-Werte als Detektionsschwellenwerte angenommen. Wenn die ermittelten LOD-Werte unter einem Wert von drei lagen, wurden beim Interval Mapping trotzdem ausschließlich Assoziationen angenommen, die diesen Wert überschritten. Das Interval Mapping wurde bei den voreingestellten Parametern durchgeführt. Die Darstellung der detektierten QTLs sowie die Markierung der Marker, für die eine Korrelation an ein Merkmal nachgewiesen werden konnten, erfolgten durch Powerpoint 2002 SP3 (Microsoft).

3. Ergebnisse

Um die Genomstruktur von *D. variabilis* zu untersuchen, sollten zunächst Mikrosatellitenmarker genutzt werden. Da bisher jedoch keine Mikrosatellitenmarker für Dahlien veröffentlicht wurden, mussten diese zuvor entwickelt werden.

3.1 Entwicklung von Mikrosatellitenmarkern für *Dahlia variabilis*

Es wurden unterschiedliche Quellen genutzt um Mikrosatellitenmarker für Dahlien zu entwickeln. Zunächst wurde versucht Marker aus anderen verwandten Gattungen innerhalb der Familie der *Asteraceae* bei Dahlien anzuwenden. Außerdem wurde eine Anreicherung auf Mikrosatellitenmotive für die Gartendahlie durchgeführt. Zudem wurden die Sequenzen einer 454-Sequenzierung für die Entwicklung von Mikrosatelliten-Primerpaaren für *D. variabilis* genutzt. Um die entwickelten Primerpaare anschließend zu testen, wurden sie für die Eltern der beiden Kartierungspopulationen K1 (T8 x M 331-6) und K5 (Karneol x Nordlicht) amplifiziert. Für den Transfer von Mikrosatellitenmarkern aus anderen Gattungen der *Asteraceae* wurden 32 Marker von Heesacker et al. (2008) getestet (siehe Tabelle 25 im Anhang). Davon konnte lediglich durch den Marker HT292 polymorphe Fragmente für die Kartierungseltern amplifiziert werden.

Nach der Mikrosatelliten-Anreicherung wurden aus insgesamt 384 Klonen 79 positive Klone identifiziert, von denen 65 sequenziert wurden. Davon zeigten 47 Klone das zu erwartende Mikrosatelliten-Motiv. Da die übrigen Sequenzen keine ausreichenden flankierenden Bereiche für die Entwicklung von Primern aufwiesen, wurden lediglich für 28 dieser Klone Primerpaare entwickelt. Durch neun der entwickelten Primerpaare wurden unspezifische Fragmente amplifiziert. Von den übrigen 19 Primerpaaren amplifizierten sieben gar keine Banden und neun Primerpaare monomorphe Fragmente für die Populationseltern. Die monomorphen Primerpaare wurden zusätzlich jeweils in 20 Nachkommen der Populationen K1 und K5 auf eine Aufspaltung überprüft. Jedoch amplifizierte keines dieser Primerpaare segregierende Fragmente für die getesteten Nachkommen. Die übrigen drei Primerpaare (DV01, DV02 und DV03) amplifizierten polymorphe Fragmente, die in den beiden Nachkommenschaften K1 und K5 aufspalteten.

Anhand des 454-Sequenzierungsansatzes wurden 28.335 Sequenzen erzeugt, in denen insgesamt 329 repetitive Elemente identifiziert wurden. Für 68 dieser repetitiven Sequenzabschnitte wurden Primerpaare entwickelt, von denen 37 unspezifische bzw. gar keine Fragmente amplifizierten. Von den übrigen 31 Primerpaaren amplifizierten 22 für die Kartierungseltern monomorphe Fragmente, die nicht in den Nachkommenschaften K1 und K5 spalteten. Anhand der übrigen zehn Primerpaare (DV04 bis DV13) wurden für die Kartierungseltern polymorphe Fragmente amplifiziert, die in den beiden untersuchten Populationen aufspalteten. So konnten letztlich insgesamt 14 informative Mikrosatellitenmarker für *D. variabilis* entwickelt werden.

3.2 Untersuchung der Genomstruktur von *Dahlia variabilis*

3.2.1 Analyse der Ploidiestufe von *Dahlia variabilis* mithilfe von Mikrosatellitenmarkern

Um Informationen über die Ploidiestufe der Gartendahlie zu erhalten, wurden für die entwickelten Mikrosatellitenmarker zunächst die Anzahlen der amplifizierten Allele pro Genotyp für verschiedene Dahlien-Genotypen ermittelt (siehe 1.3.2). Dafür wurden die Marker auf die beiden Gartendahlie-Populationen K1 und K5 sowie bei 16 Genotypen aus zwölf unterschiedlichen Dahlienwildarten angewendet. Diploide weisen gewöhnlich maximal zwei Allele, Tetraploide vier Allele und Oktoploide maximal acht Allele pro Genotyp für einen Mikrosatellitenmarker auf. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in der folgenden Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6: Anzahlen maximal amplifizierter Banden pro Genotyp für die Populationen K1 (130 Genotypen) und K5 (173 Genotypen) sowie für eine Sammlung von Dahlienwildarten mit $2n = 32$ Chromosomen (8 Genotypen) oder $2n = 64$ Chromosomen (8 Genotypen)

Marker	Populationen				Wildarten			
	K1		K5		2n = 64		2n = 32	
	Gesamt ¹	Max ²	Gesamt	Max	Gesamt	Max	Gesamt	Max
DV01	2	2	2	2	--	--	--	--
DV02	3	3	3	3	--	--	--	--
DV03	6	6	5	5	9	3	3	1
DV04	2	2	2	2	--	--	--	--
DV05	6	6	6	5	11	3	3	2
DV06	3	3	3	3	5	2	4	2
DV07	4	3	4	4	--	--	--	--
DV08	7	7	7	7	10	3	3	1
DV09	4	4	4	4	--	--	--	--
DV10	8	8	6	6	11	3	3	2
DV11	6	5	6	6	9	4	4	3
DV12	4	4	4	4	--	--	--	--
DV13	7	7	7	7	11	4	4	2
HT292	4	4	4	4	--	--	--	--

1 = Anzahl unterschiedlicher Allele je Population bzw. Wildarten einer Ploidiestufe insgesamt
2 = maximale Anzahl Fragmente je Genotyp

Für die Population K1 wurden anhand der 14 entwickelten Mikrosatellitenmarker insgesamt 66 unterschiedliche Allele amplifiziert, von denen 64 in der Nachkommenschaft aufspalteten. Für die Population K5 wurden insgesamt 63 verschiedene Allele amplifiziert, von denen 62 Polymorphismen zeigten. Die Marker wiesen für die Populationen K1 durchschnittlich maximal 4,6 und für die Population K5 4,5 Allele pro Genotyp auf.

Anhand der beiden Marker DV01 und DV04 wurden für die einzelnen Genotypen der beiden Populationen K1 und K5 jeweils maximal zwei Allele pro Genotyp amplifiziert. Durch die sechs Mikrosatelliten-Primerpaare DV02, DV06, DV07, DV09, DV12 und HT292 wurden für beide Populationen maximal drei oder vier Allele pro Genotyp amplifiziert. Anhand der sechs Mikrosatellitenmarker DV03, DV05, DV08, DV10, DV11 und DV13 wurden maximal zwischen fünf und acht Allele für die einzelnen Genotypen der beiden untersuchten Populationen amplifiziert.

In den Dahlienwildarten wurden sieben der entwickelten Mikrosatellitenmarker angewendet, durch die für die Arten mit $2n = 64$ Chromosomen insgesamt 66 unterschiedliche Allele amplifiziert wurden. Die durchschnittliche Anzahl an maximal

amplifizierten Allelen pro Genotypen betrug für die Wildarten mit $2n = 64$ Chromosomen 3,1. Anhand des Markers DV06 wurden maximal zwei Allele pro Genotyp amplifiziert. Dieser Marker wies in den Populationen K1 und K5 allerdings ebenfalls lediglich maximal drei Allele pro Genotyp auf. Durch die übrigen sechs Marker DV03, DV05, DV08, DV10, DV11 und DV13 wurden für die Wildarten mit $2n = 64$ Chromosomen maximal drei bis vier Allele pro Genotyp detektiert.

Für die Wildarten mit $2n = 32$ Chromosomen wurden anhand der angewendeten Mikrosatellitenmarker insgesamt 24 verschiedene Allele, amplifiziert. Anhand der sechs Marker DV03, DV05, DV06, DV08, DV10 und DV13 wurden zwischen einem und zwei Allele je Genotyp nachgewiesen. Lediglich der Marker DV11 amplifizierte maximal drei Allele für einige Genotypen. In den Wildarten mit $2n = 32$ Chromosomen wurden anhand der angewendeten Mikrosatellitenmarker durchschnittlich maximal 1,9 Allele je Genotyp amplifiziert.

Für die Wildarten *D. dissecta* ($2n = 34$ Chromosomen) und *D. merckii* ($2n = 36$ Chromosomen) wurden für keinen Mikrosatellitenmarker mehr Allele als die maximale Anzahl an Allelen für die Arten mit $2n = 32$ Chromosomen ermittelt. Da diese Wildarten wahrscheinlich aneuploide Formen einiger Arten mit $2n = 32$ Chromosomen darstellen (Sörensen 1969, Johnson und Brandham 1997), wurden sie bei der Ermittlung der maximalen Anzahl an Allelen pro Genotyp nicht berücksichtigt. Bis auf zwei Ausfälle (DV10 für *D. dissecta* und DV06 für *D. merckii*) amplifizierten alle Mikrosatellitenmarker für die unterschiedlichen Dahlienwildarten stets diskrete Banden. Die Primersequenzen, die Annealingtemperaturen und die Fragmentgrößen der Marker sind im Anhang in Tabelle 33 aufgelistet.

3.2.2 Bestimmung des Ploidietypus von *Dahlia variabilis* anhand von Mikrosatellitenmarkern

Um Informationen über die Chromosomenpaarung der Gartendahlie zu erhalten, wurden die Spaltungsmuster der 14 Mikrosatellitenmarker für die beiden Populationen K1 (130 Individuen) und K5 (173 Individuen) untersucht. Ein Beispiel für das Spaltungsmuster eines Mikrosatellitenmarkers für die Population K5 ist in der folgenden Abbildung 2 dargestellt.

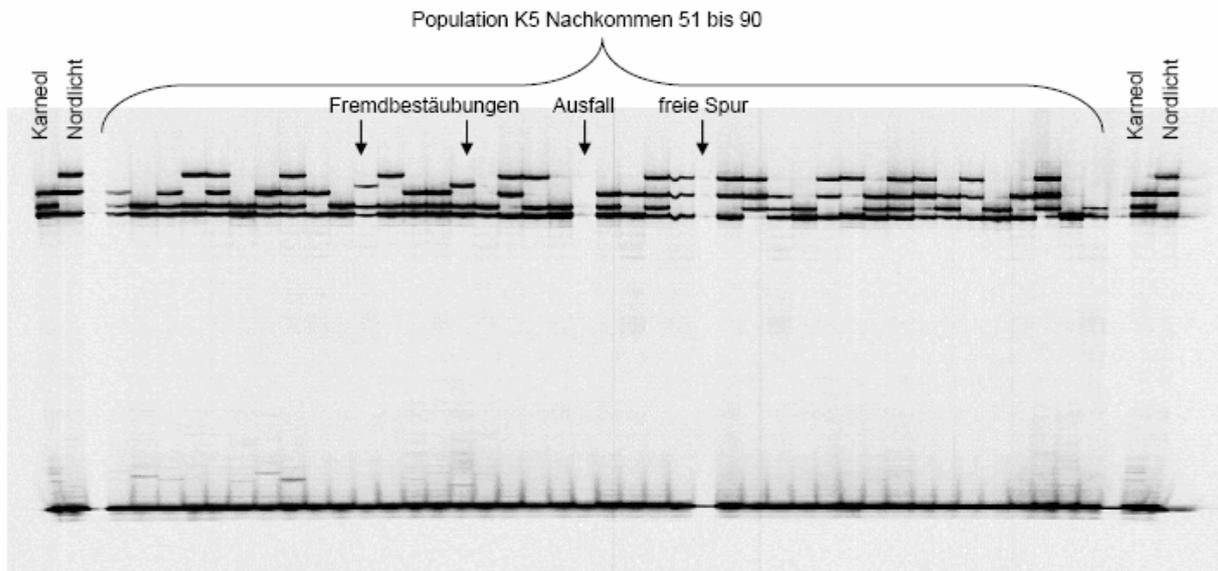


Abbildung 2: Ausschnitt des Spaltungsmusters des Mikrosatellitenmarkers DV09, der in der Population K5 angewendet wurde. Links und rechts wurden jeweils einmal die beiden Populationseltern Karneol und Nordlicht aufgetragen und eine Spur zu den Nachkommen freigelassen.

Es waren für keinen Marker Allele zu beobachten, die nicht miteinander oder aufgrund fixierter Heterozygotie immer miteinander vererbt wurden. Stattdessen war für alle Mikrosatellitenmarker eine freie Kombination aller amplifizierten Allele in den Populationen K1 und K5 zu beobachten.

Die Spaltungsverhältnisse der Mikrosatellitenmarker, die entsprechenden Chi-Quadrat-Werte und die Häufigkeiten der unterschiedlichen Allelkombinationen für die Populationen K1 und K5 sind auf der im Anhang beigefügten CD aufgeführt.

3.2.3 Spaltungsanalysen in den Populationen K1 und K5

Die Spaltungsdaten der Marker für die Populationen K1 und K5 wurden anhand des Chi-Quadrat-Anpassungstests (Pearson 1900) darauf überprüft, ob sie den zu erwartenden Spaltungsverhältnissen für Autopolyploide und Allopolyploide für die beiden Ploidiestufen Tetraploid und Oktoploid (siehe Tabellen 20 und 21 im Anhang) entsprechen.

In der Population K1 wurde die Spaltungsanalyse für die 64 segregierenden Allele, welche durch die 14 Mikrosatellitenmarker amplifiziert wurden, durchgeführt. Für 19 der spaltenden Allele konnte anhand des Chi-Quadrat-Anpassungstests keines der Spaltungsverhältnisse nachgewiesen werden, auf welche die Markerdaten getestet

wurden. Für acht der amplifizierten Allele wurden mehrere unterschiedliche Spaltungsverhältnisse nachgewiesen. Die übrigen 37 spaltenden Fragmente wurden jeweils lediglich einem Spaltungsverhältnis zugeordnet. In der folgenden Tabelle 7 sind die Anzahlen der Marker, welche den unterschiedlichen Spaltungsverhältnissen entsprechen, aufgelistet. Die SD-Marker wurden als nicht informativ klassifiziert, da sie keinen Rückschluss auf den Ploidietypus und die Ploidiestufe zulassen. Für die MD-Marker wurde jeweils die Art der Vererbung (disom oder polysom) und die entsprechende Ploidiestufe (tetraploid oder oktoploid) angegeben, auf welche die Spaltungsverhältnisse dieser Marker deuteten.

Tabelle 7: Spaltungsverhältnisse für die Population K1 der 37 eindeutig spaltenden Mikrosatellitenmarker-Allele

parentale Konstitution	Spaltungsverhältnis	Anzahl Marker ¹	Spaltungstyp
maternal	1:1	8	nicht informativ ²
paternal	1:1	8	nicht informativ
paternal	1:2	7	verschoben ³
maternal	3:1	3	disom 4x ⁴ oder 8x ⁵
paternal	3:1	4	disom 4x oder 8x
biparental	3:1	5	nicht informativ
maternal	7:1	1	disom 8x
biparental	7:1	1	disom 4x oder 8x

- 1 = Anzahl der Marker die dem jeweiligen Spaltungsverhältnis entsprechen
 2 = Singeldose Marker; spalten für alle Ploidiestufen und Ploidietypen gleich
 3 = entspricht keinem zu erwartenden Spaltungsverhältnis für Polyploide
 4 = tetraploid
 5 = oktoploid

Von den 37 Allelen, für die in der Population K1 jeweils nur ein Spaltungsverhältnis nachgewiesen wurde, wiesen insgesamt 21 eine 1:1 bzw. eine 3:1 Spaltung auf, wie sie für SD-Marker zu erwarten sind. Für sieben paternale Fragmente wurde eine verschobene Spaltung in dem Verhältnis 1:2 nachgewiesen. Weitere sieben uniparentale Allele der Mikrosatellitenmarker spalteten in einem Verhältnis von 3:1, das charakteristisch für eine disome Vererbung ist. Für lediglich einen maternalen Marker wurde ein Spaltungsverhältnis von 7:1 nachgewiesen, das charakteristisch für Alloktoploide ist. Für einen biparentalen Marker wurde ebenfalls eine 7:1 Spaltung nachgewiesen, die sowohl für Allotetraploide als auch für Alloktoploide zu erwarten ist.

Für die Population K5 wurden insgesamt 1334 AFLP[®]- und Mikrosatellitenfragmente ausgewertet und in die Spaltungsanalyse einbezogen. Davon wurden 328 der

AFLP[®]-Marker von R. Chaudhary beigetragen (Chaudhary 2011). Die übrigen 1006 Marker umfassen 62 spaltende Allele, welche durch die 14 entwickelten Mikrosatellitenmarker amplifiziert wurden, sowie 944 AFLP[®]-Fragmente, die anhand von 40 Primerkombinationen amplifiziert wurden.

Von den insgesamt 1334 Markern wurden in der Population K5 für 265 (19,86 %) Marker mehrere Spaltungsverhältnisse nachgewiesen. Weitere 273 (20,46 %) Marker konnten gar keinem Spaltungsverhältnis zugeordnet werden. Die übrigen 796 (59,67 %) Marker konnten durch den Chi-Quadrat-Anpassungstest einem einzelnen Spaltungsverhältnis zugeordnet werden. Die Anzahlen dieser Marker für die unterschiedlichen Spaltungsverhältnisse, sind in der folgenden Tabelle 8 aufgelistet.

Tabelle 8: Spaltungsverhältnisse für die Population K5 der 796 AFLP[®]- und Mikrosatellitenmarker mit einem eindeutigen Spaltungsverhältnis

Parentale Konstitution	Spaltungsverhältnis	Anzahl Marker ¹	Spaltungstyp
maternal	1:1	206	nicht informativ ²
paternal	1:1	122	nicht informativ
maternal	1:2	1	verschoben ³
paternal	1:2	83	verschoben
biparental	1:2	2	verschoben
maternal	3:1	38	disom 4x ⁴ oder 8x ⁵
paternal	3:1	33	disom 4x oder 8x
biparental	3:1	206	nicht informativ
maternal	5:1	3	polysom 4x
paternal	5:1	1	polysom 4x
biparental	7:1	97	disom 4x oder 8x
maternal	69:1	4	polysom 8x

1 = Anzahl die Marker die dem jeweiligen Spaltungsverhältnis entsprechen

2 = Singeldose Marker; spalten für alle Ploidiestufen und Ploidietypen gleich

3 = entspricht keinem der zu erwartenden Spaltungsverhältnis für Polyplioide

4 = tetraploid

5 = oktoploid

Von den 796 Markern, für die lediglich ein Spaltungsverhältnis nachgewiesen wurde, spalteten 534 Marker als SD-Marker und waren somit für die Untersuchung der Genomstruktur nicht informativ. Für 86 Marker wurde eine verschobene Spaltung mit dem Verhältnis 1:2 nachgewiesen. Für insgesamt 168 Marker wurden disome Spaltungsverhältnisse nachgewiesen. Da die Spaltungsverhältnisse dieser Marker sowohl für Allotetraploide als auch für Allooktoploide zu erwarten sind (siehe

Tabellen 20 und 21 im Anhang), lieferten diese Marker keine Information über die Ploidiestufe. Lediglich für vier Marker wurden tetrasome Spaltungsverhältnisse nachgewiesen, die charakteristisch für Autotetraploide sind. Weitere vier Marker konnten oktosomen Spaltungsverhältnissen zugeordnet werden. Diese Marker deuten daher auf eine Autooktoploidie für die Gartendahlie.

Die meisten angenommenen Spaltungsverhältnisse für die beiden Populationen K1 und K5 entsprechen einer disomen Vererbung und deuten somit auf eine Allopolyploidie. Jedoch lassen die entsprechenden Marker keinen Rückschluss auf die Ploidiestufe zu, da die Spaltungsverhältnisse sowohl für Allotetraploide als auch für Allooktoploide zu erwarten sind. Lediglich für einen Marker wurde ein Spaltungsverhältnis nachgewiesen, dass ausschließlich auf eine Allooktoploidie hinweist. Für die Population K5 wurden zudem sowohl vier tetrasome als auch vier oktosome Spaltungsverhältnisse angenommen. Außerdem wurde für viele Marker gar kein Spaltungsverhältnis bzw. das verschobene Spaltungsverhältnis von 1:2 angenommen. Eine detaillierte Darstellung der Chi-Quadrat-Werte der Marker, die für die Populationen K1 und K5 ausgewertet wurden, ist auf der im Anhang beiliegenden CD aufgeführt.

3.2.4 Verhältnis von Singledosemarkern zu Multidosemarkern für die Dahlienpopulation K5

Für die Population K5 wurden alle 1334 ausgewerteten Marker anhand des geometrischen Mittels (siehe 2.6.1) einer der beiden Klassen SD- oder MD-Marker zugewiesen. Das so ermittelte Verhältnis von SD- zu MD-Markern wurde anschließend anhand des Chi-Quadrat-Anpassungstests (Pearson 1900) auf die theoretischen Verhältnisse von SD zu MD-Markern für Autopolyploide (0,7:0,3) und Allopolyploide (0,56:0,44) getestet. Das Signifikanzniveau lag bei $\chi^2_{0,95} (df = 1) = 3,84$. Die Ergebnisse des Chi-Quadrat-Anpassungstests sind in der folgenden Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9: Verhältnis von SD-Markern zu MD-Markern für die Population K5

	beobachtet	erwartet Autopolyploide ¹	erwartet Allopolyploide ¹
SD-Marker	931	933,8	747,04
MD-Marker	403	400,2	586,96
Gesamt	1334	1334	1334
Chi-Quadrat-Wert	--	0,028	102,96

¹ = nach Da Silva et al. (1993)

Anhand des nachgewiesenen Verhältnisses von SD- zu MD-Markern für die Population K5 wurde die Hypothese der Allopolyploidie mit einer signifikanten Abweichung von $\chi^2_{0,95} (df = 1) = 102,96$ abgelehnt. Die Hypothese der Autopolyploidie wurde hingegen bei einer nicht signifikanten Abweichung von $\chi^2_{0,95} (df = 1) = 0,03$ klar angenommen.

3.2.5 Verhältnis von Attraktionskopplungen zu Repulsionskopplungen für die Dahlienpopulation K5

Für die Kartierungseltern Karneol und Nordlicht wurden insgesamt 569 uniparentale (284 für Karneol und 285 für Nordlicht) SD-Marker selektiert. Anhand dieser Marker wurde das Verhältnis von Attraktionskopplungen zu Repulsionskopplungen ermittelt. Von den 569 verwendeten Markern konnten für 402 Marker (199 für Karneol und 203 für Nordlicht) Attraktionskopplungen nachgewiesen werden. Lediglich für die Kopplungsgruppe (KG) N1 des väterlichen Kartierungselters Nordlicht wurden acht Kopplungen in der Repulsionsphase detektiert. Diese Repulsionskopplungen wurden jedoch bei LOD-Werten zwischen 0 und 1,78 nachgewiesen. Die KG N1 wurde hingegen anhand des originalen Datensatzes bei einem LOD-Wert von 10 berechnet. Da außerdem keine weiteren Kopplungen zwischen den beiden Datensätzen nachgewiesen werden konnten, wurden die Repulsionskopplungen aufgrund der niedrigen LOD-Werte als nicht signifikant angenommen. Somit beträgt das berechnete Verhältnis von Attraktionskopplungen zu Repulsionskopplungen für die Population K5 1:0.

Das Verhältnis von Attraktionskopplungen zu Repulsionskopplungen wurde anschließend durch den Chi-Quadrat-Anpassungstest (Pearson 1900) bei einem Signifikanzniveau von $\chi^2_{0,95} (df = 1) = 3,84$ auf die theoretischen Verhältnisse für Allopolyploidie (1:1), Autotetraploidie (1:0,25) sowie für höhere Plodiestufen der

Autopolyploidie (1:0) geprüft (Wu et al. 1992). Die Ergebnisse dieses Tests sind in der folgenden Tabelle 10 zusammengefasst.

Tabelle 10: Chi-Quadrat-Werte für das Verhältnis von Attraktionskopplungen zu Repulsionskopplungen für die Population K5

Ploidiestatus	Erwartete Verteilung	Chi-Quadrat-Wert
Allopolyploid	201:201 (1:1) ¹	402,00
Autopolyploid (4x) ²	321,6:80,4 (1:0,25) ¹	100,50
Autopolyploid (>4x) ³	402:0 (1:0) ¹	0,00

1 = erwartete Verhältnisse von Attraktionskopplungen zu Repulsionskopplungen nach Wu et al. (1992)

2 = tetraploid

3 = höhere Ploidiestufen als tetraploid

Anhand des ermittelten Verhältnisses von Attraktionskopplungen zu Repulsionskopplungen für die Population K5 wurde die Hypothese einer Allopolyploidie bei einer signifikanten Abweichung von $\chi^2_{0,95} (df = 1) = 402,00$ eindeutig abgelehnt. Die Hypothese einer Autotetraploidie wurde bei einer signifikanten Abweichung von $\chi^2_{0,95} (df = 1) = 100,50$ ebenfalls abgelehnt. Die Hypothese einer Autopolyploidie mit einer höheren Ploidiestufe konnte hingegen mit $\chi^2_{0,95} (df = 1) = 0,00$ klar angenommen werden. Die JoinMap-Datei, anhand der das Verhältnis von Attraktionskopplungen zu Repulsionskopplungen berechnet wurde, ist auf der CD im Anhang hinterlegt.

3.3 Genetische Kopplungskarte für die Dahlienpopulation K5

Insgesamt wurden 1334 AFLP[®]- und Mikrosatellitenfragmente für die Population K5 ausgewertet. Daraus wurden für die Mutter Karneol 284 und für den Vater Nordlicht 285 uniparentale SD-Marker selektiert. Von den biparentalen Markern wurden 362 Marker als SD-Marker klassifiziert. Daher wurde die Kartierung für die beiden Eltern der Population K5 letztlich anhand von insgesamt 1293 SD-Markern durchgeführt, von denen 1023 Marker kartiert werden konnten. Von diesen kartierten Markern waren 1021 Marker in der Attraktionsphase und zwei Marker in der Repulsionsphase gekoppelt. Der prozentuale Anteil an kartierten Markern in der Repulsionsphase beträgt somit 0,02 %. Die Marker, welche in der Repulsionsphase kartiert wurden, sind in den Kopplungskarten für die Eltern der Population K5 in den Abbildungen 3 bis 5 (siehe Kapitel 3.3.1 bis 3.3.3) mit einem grünen Pfeil markiert.

Da *D. variabilis* 64 Chromosomen besitzt, wäre zu erwarten, dass für jeden Kartierungselter 32 Kopplungsgruppen (die Anzahl der Chromosomen des haploiden Chromosomensatzes) berechnet werden können. Jedoch wurden für die Eltern der Population K5 insgesamt 151 Kopplungsgruppen (73 für Karneol und 78 für Nordlicht) nachgewiesen. Die Daten der berechneten genetischen Kopplungskarten für beide Kartierungseltern sind in der nachfolgenden Tabelle 11 zusammengefasst.

Tabelle 11: Zusammenfassung der Ergebnisse der berechneten Kopplungskarten für die Populationseltern Karneol und Nordlicht

Parameter	Karneol	Nordlicht
Anzahl selektierter SD-Marker	646	647
Anzahl kartierter SD-Marker	532	491
Anzahl KGs	73	78
Kartenlänge	2751 cM	3086 cM
durchschnittliche Markerdistanz	5,2 cM	6,3 cM
maximale Markerdistanz	35,7 cM	37,00 cM
Abdeckung ¹	17,62 %	22,43 %
Genomgröße ¹	15611 cM	13759 cM
verschobene Spaltung ²	55,26 %	40,73 %

1 = nach Stein et al. (2007)

2 = nach JoinMap Version 4 (Van Ooijen 2006)

Bei der weiteren Analyse der Kartierungsdaten wurden zunächst kürzere Kopplungsgruppen (KGs), auf denen weniger als vier Marker kartiert waren, verworfen. Da sich jedoch herausstellte, dass auf diesen kürzeren KGs häufig biparentale AFLP[®]-Marker lokalisiert waren, und diese daher Homöologengruppen zugeordnet werden konnten, wurden letztlich alle berechneten KGs in die erstellten Karten einbezogen. Die LOD-Werte, bei denen die einzelnen KGs jeweils berechnet wurden, sind im Anhang in den Tabellen 34 und 35 aufgelistet. Die Markerdatenmatrix für die Population K5 und die JoinMap-Datei der berechneten Kopplungskarte sind auf der CD im Anhang beigelegt. Die Ergebnisse des *Kruskal-Wallis*-Tests sowie des Interval Mappings, die in den abgebildeten Karten vermerkt wurden, sind in den Kapiteln 3.4.1 bis 3.4.3 im Detail beschrieben.

3.3.1 Maternale Karte

Für die Kartierungsmutter Karneol wurden 73 KGs durch 532 von insgesamt 646 (284 uniparentale und 362 biparentale) SD-Markern berechnet. Von diesen 73 KGs konnten 46 anhand der Mikrosatelliten- bzw. biparentalen AFLP[®]-Marker in 28 unterschiedliche Homöologengruppen eingeteilt werden. Die verbliebenen 27 KGs, die keiner Gruppe zugeordnet wurden, sind in der Abbildung 4 dargestellt.

Die LOD-Werte, bei denen die KGs berechnet wurden, sind in den Tabellen 34 und 35 im Anhang aufgelistet. Die Chi-Quadrat-Werte der kartierten Marker sowie ihre Zuordnung zu den unterschiedlichen KGs sind auf der CD im Anhang aufgeführt. Die Legende für die berechneten genetischen Kopplungskarten beider Eltern in den Abbildungen 4 bis 6 ist in der folgenden Abbildung 3 aufgeführt.

Legende für die Abbildungen 4 bis 6:	
HG	= Homöologengruppe
K...	= Karneol Kopplungsgruppe Nummer
N...	= Nordlicht Kopplungsgruppe Nummer
.....X	= Marker von Chaudhary 2011
-----	= Verbindung homologer bzw. homöologer Kopplungsgruppen auf Basis von Mikrosatellitenmarkern
—	= Verbindung homologer bzw. homöologer Kopplungsgruppen auf Basis von biparentalen AFLP-Markern
→	= Marker in Repulsionsphase kartiert
→	= Marker, für die anhand des <i>Kruskal-Wallis</i> -Testes eine Assoziation an ein phänotypisches Merkmal nachgewiesen wurde
*	= Signifikant bei $P < 0.05$
**	= Signifikant bei $P < 0.01$
***	= Signifikant bei $P < 0.001$
****	= Signifikant bei $P < 0.0001$
■	= QTL, der durch Intervall Mapping nachgewiesen wurde; jeweils rechts von der entsprechenden KG dargestellt.
Anz. Blbl.	= Anzahl Blütenblätter
Bl. Durchm.	= Blütenstandsdurchmesser
Blüst. Läng.	= Blütenstiellänge
Breite Zubl.	= Breite Zungenblüten
Länge Zubl.	= Länge Zungenblüten
1	= Umwelt 1 2009 Herrenhausen
2	= Umwelt 2 2010 Herrenhausen
3	= Umwelt 3 2010 Ruthe

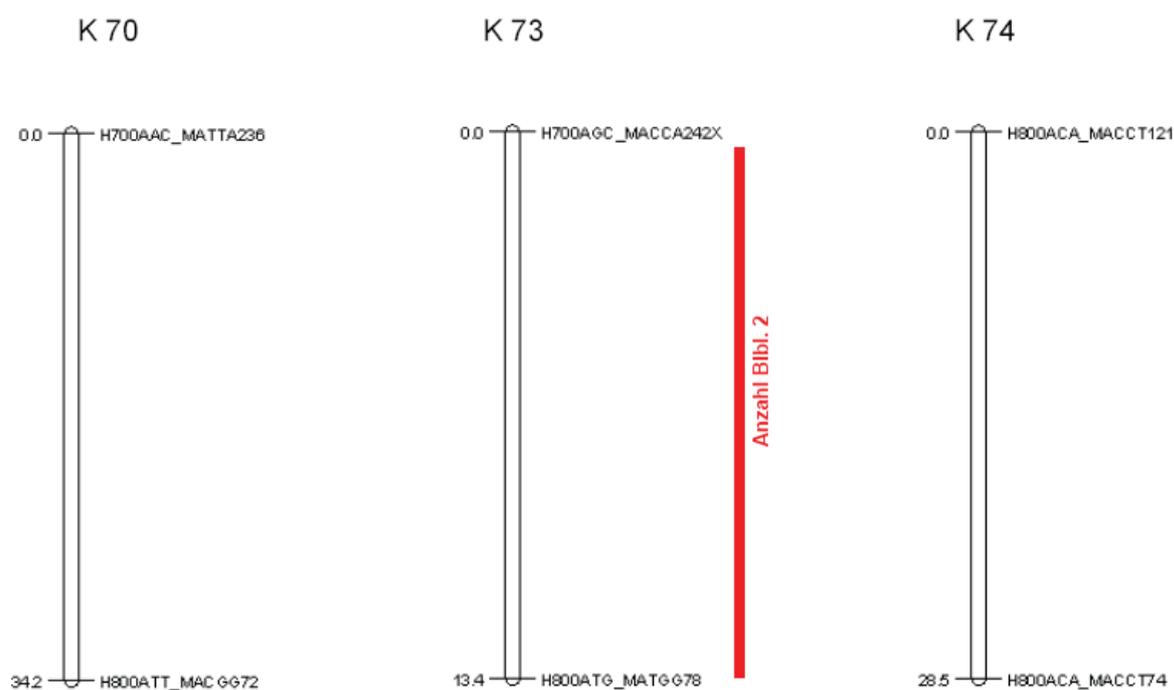
Abbildung 3: Legende der berechneten Kopplungskarten für die Kartierungseltern der Population K5 Nordlicht und Karneol in den folgenden Abbildungen 4 bis 6



Abbildung 4: Kopplungsgruppen der Kartierungsmutter Karneel, die keiner Homologengruppe zugeordnet wurden. Für Marker, die mit einem roten Pfeil markiert sind, wurde anhand des *Kruskal-Wallis*-Tests eine Assoziation an ein phänotypisches Merkmal nachgewiesen. Die roten Balken rechts neben den KGs markieren die berechneten QTLs. Die Abkürzungen für die Merkmalsbezeichnungen sind in Abbildung 2 erklärt. Die genetischen Distanzen zwischen den kartierten Markern sind in Centimorgan (cM) angegeben.



Fortsetzung Abbildung 4: Kopplungsgruppen der Kartierungsmutter Karneol, die keiner Homologengruppe zugeordnet wurden. Für Marker, die mit einem roten Pfeil markiert sind, wurde anhand des *Kruskal-Wallis*-Tests eine Assoziation an ein phänotypisches Merkmal nachgewiesen. Die roten Balken rechts neben den KGs markieren die berechneten QTLs. Die Abkürzungen für die Merkmalsbezeichnungen sind in Abbildung 2 erklärt. Die genetischen Distanzen zwischen den kartierten Markern sind in Centimorgan angegeben.



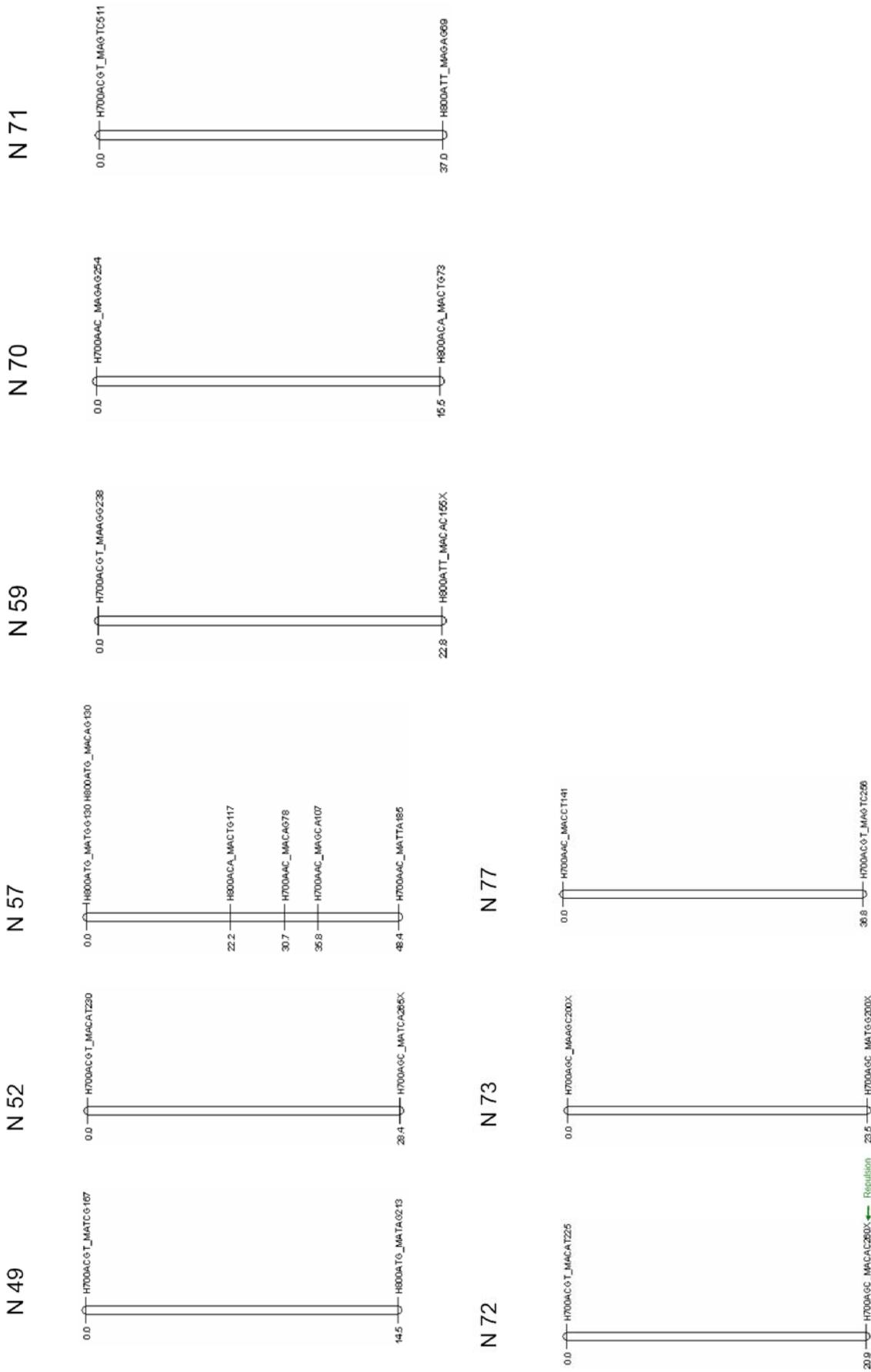
Fortsetzung Abbildung 4: Kopplungsgruppen der Kartierungsmutter Karneol, die keiner Homöologengruppe zugeordnet wurden. Die roten Balken rechts neben den KGs markieren die berechneten QTLs. Die Abkürzungen für die Merkmalsbezeichnungen sind in Abbildung 2 erklärt. Die genetischen Distanzen zwischen den kartierten Markern sind in Centimorgan angegeben.

Die 73 KGs, welche für die Kartierungsmutter Karneol berechnet wurden, umfassen eine Gesamtlänge von 2750 cM mit einem durchschnittlichen Abstand von 5,2 cM zwischen den Markern. Nach Stein et al. (2007) wäre daher davon auszugehen, dass die Abdeckung des Genomes von Karneol durch die berechnete Karte 17,6 % beträgt. Demnach würde das Genom eine Gesamtgröße von 15611 cM umfassen. Die größte Distanz zweier Marker beträgt 35,7 cM auf der KG 65 zwischen den beiden Markern H700AAC_MACTG280 und H800ATT_MACCG120. Für 294 (55,3 %) der insgesamt 532 kartierten SD-Marker wurde anhand der Kartierungssoftware JoinMap Version 4 eine verschobene Spaltung nachgewiesen. Der einzige Marker, der für Karneol in der Repulsionsphase kartiert wurde, ist der Marker H700ACGT_MACAC102 auf der KG K14 in der Homöologengruppe 9 (siehe Abbildung 5).

Die KG K23 wurde zunächst berechnet. Jedoch konnte die Kopplungsphase des Markers H800ACA_MACCT92 nicht bestimmt werden. Da dieser KG lediglich ein weiterer Marker (H800ATT_MACTG225X) zugeordnet wurde, war so letztlich keine visuelle Darstellung der Markeranordnung möglich. Die KG K60 besteht lediglich aus zwei Markern, die mit einem Abstand von 0 cM zueinander kartiert wurden. Auf den KGs K1, K4, K28, K33 und K38 wurden relativ viele Marker teilweise recht nah beieinander kartiert. Die übrigen KGs wiesen eine geringere Markerdichte auf. Auf den KGs K22, K24, K39, K47, K50, K58, K59, K65, K66, K67 und K69 wurden jeweils lediglich zwei oder drei Marker kartiert.

3.3.2 Paternale Karte

Für den väterlichen Kartierungselter Nordlicht wurden 647 (285 uniparentale und 362 biparentale) SD-Marker selektiert. Anhand von 491 dieser SD-Marker konnten 78 KGs berechnet werden, von denen 57 KGs 29 unterschiedlichen Homöologengruppen zugeordnet wurden. Die übrigen 21 KGs, für die keine Homöologengruppe identifiziert werden konnte, sind in der folgenden Abbildung 4 dargestellt.



Fortsetzung Abbildung 5: Kopplungsgruppen des Kartierungsvaters Nordlicht, die keiner Homöologengruppe zugeordnet wurden. Der grüne Pfeil zeigt einen Marker, der in der Repulsionsphase gekoppelt ist. Die genetischen Distanzen zwischen den kartierten Markern sind in Centimorgan angegeben.

Die Kopplungskarte für den Kartierungsvater Nordlicht umfasst eine Gesamtlänge von 3086 cM bei einem durchschnittlichen Markerabstand von 6,28 cM. Demnach beträgt die Genomabdeckung anhand der berechneten Karte für Nordlicht nach Stein et al. (2007) 22,4 %. Dies würde einer Genomgröße von insgesamt 13758 cM entsprechen. Die größte Distanz zwischen zwei Markern (H700_MAGTC511 und H800_MAGAG69) beträgt 37 cM auf der KG N71. Von den insgesamt 491 kartierten SD-Markern wiesen 211 (40,7 %) eine verschobene Spaltung auf. Für den Kartierungsvater Nordlicht wurde ebenfalls lediglich ein Marker (H700AGC_MACAC-260X auf der KG N72, die keiner Homöologengruppe zugeordnet wurde) in der Repulsionsphase kartiert. Dieser Marker war mit einem Abstand von 20,9 cM relativ schwach an den einzigen weiteren Marker, welcher auf der KG N72 kartiert wurde, gekoppelt.

Auf den KGs N18, N26 und N33 wurden verhältnismäßig hohe Anzahlen von Markern recht eng aneinander kartiert. Auf den KGs N7, N8, N16, N17, N28, N41, N43, N49, N52, N59, N70, N71, N72, N73 und N77 wurden hingegen lediglich zwei bis drei Marker in größeren Abständen zueinander lokalisiert.

3.3.3 Identifizierung der Homöologengruppen von *Dahlia variabilis*

Die Zuordnung der KGs in unterschiedliche Homöologengruppen erfolgte für die beiden Kartierungseltern Karneol und Nordlicht zunächst anhand der kartierten Mikrosatellitenmarker. Alle KGs auf denen die unterschiedlichen Allele eines Mikrosatellitenmarkers kartiert waren, wurden in Gruppen zusammengefasst. Die Anzahlen an Allelen, die für die einzelnen Marker auf verschiedenen KGs kartiert wurden, sind in der folgenden Tabelle 12 aufgeführt.

Tabelle 12: Anzahlen kartierter Mikrosatellitenmarker-Allele auf unterschiedlichen Kopplungsgruppen für die beiden Eltern der Population K5 Karneol und Nordlicht

Homöologengruppe	Mikrosatellitenmarker	Allele Karneol	Allele Nordlicht
1	DV13	3 (3)	4 (4)
	DV10	2 (4) ¹	2 (4)
2	DV03	2 (3)	4 (4)
3	DV05	2 (3)	3 (4)
	DV07	1 (2)	2 (2)
	DV12	1 (4)	2 (2)
	HT292	1 (3)	1 (3)
4	DV08	3 ² (5)	1 (2)
5	DV02	2 (3)	1 (2)
6	DV09	2 (4)	0 (1)
7	DV11	0 (2)	3 (4)

1 = Lesebeispiel: für den Marker DV10 wurden für Karneol zwei von insgesamt vier amplifizierten Allelen kartiert
 2 = zwei Allele des Markers DV08 wurden auf der KG K5 kartiert

Anschließend wurden die biparentalen AFLP[®]-Singledosemarker zwischen den KGs beider Eltern verbunden um weitere homologe bzw. homöologe KGs zu identifizieren.

Die MD-Marker, durch deren Kartierung den erstellten Homöologengruppen weitere KGs zugeteilt werden sollten, verbanden einzelne KGs zwischen den unterschiedlichen Homöologengruppen. Diese Verknüpfungen durch die MD-Marker konnten jedoch nicht durch die Mikrosatelliten- und AFLP[®]-Marker nachvollzogen werden. Zudem wiesen einige der 3:1 spaltenden MD-Marker Kopplungen an bis zu vier KGs auf, obwohl für sie lediglich eine Duplex-Konstellation zu erwarten wäre. Deshalb wurden die zunächst kartierten MD-Marker letztlich wieder aus den Kopplungskarten entfernt, und die Einteilung der KGs in unterschiedliche Homöologengruppen wurde ausschließlich auf Basis der Mikrosatelliten- und der biparentalen AFLP[®]-Singledosemarker durchgeführt. Auf diese Weise wurden 29 Homöologengruppen erstellt, denen 103 KGs (Karneol: 46 KGs, Nordlicht: 57 KGs) von insgesamt 151 KGs (Karneol: 73 KGs, Nordlicht: 78 KGs) zugeordnet werden konnten. Die einzelnen Homöologengruppen sind im folgenden Kapitel 3.3.4 detailliert beschrieben. Die Unterteilung der KGs in Homöologengruppen ist in den Tabellen 36 und 37 im Anhang zusammengefasst. Die KGs auf denen die MD-Marker kartiert wurden, sind auf der CD im Anhang aufgelistet.

Um eine bessere Übersicht zu gewährleisten, wurden die Homöologengruppen 1 bis 3 in der nachfolgenden Abbildung 5 zunächst einmal ohne die Verbindungen durch die biparentalen AFLP[®]-Marker zwischen den entsprechenden KGs abgebildet. Anschließend wurde jeweils dieselbe Homöologengruppe noch einmal mit durchgehenden Linien zwischen den biparentalen AFLP[®]-Markern dargestellt. Die Legende für die berechneten genetischen Karten und die erstellten Homöologengruppen wurde bereits unter 3.3.1 dargestellt.

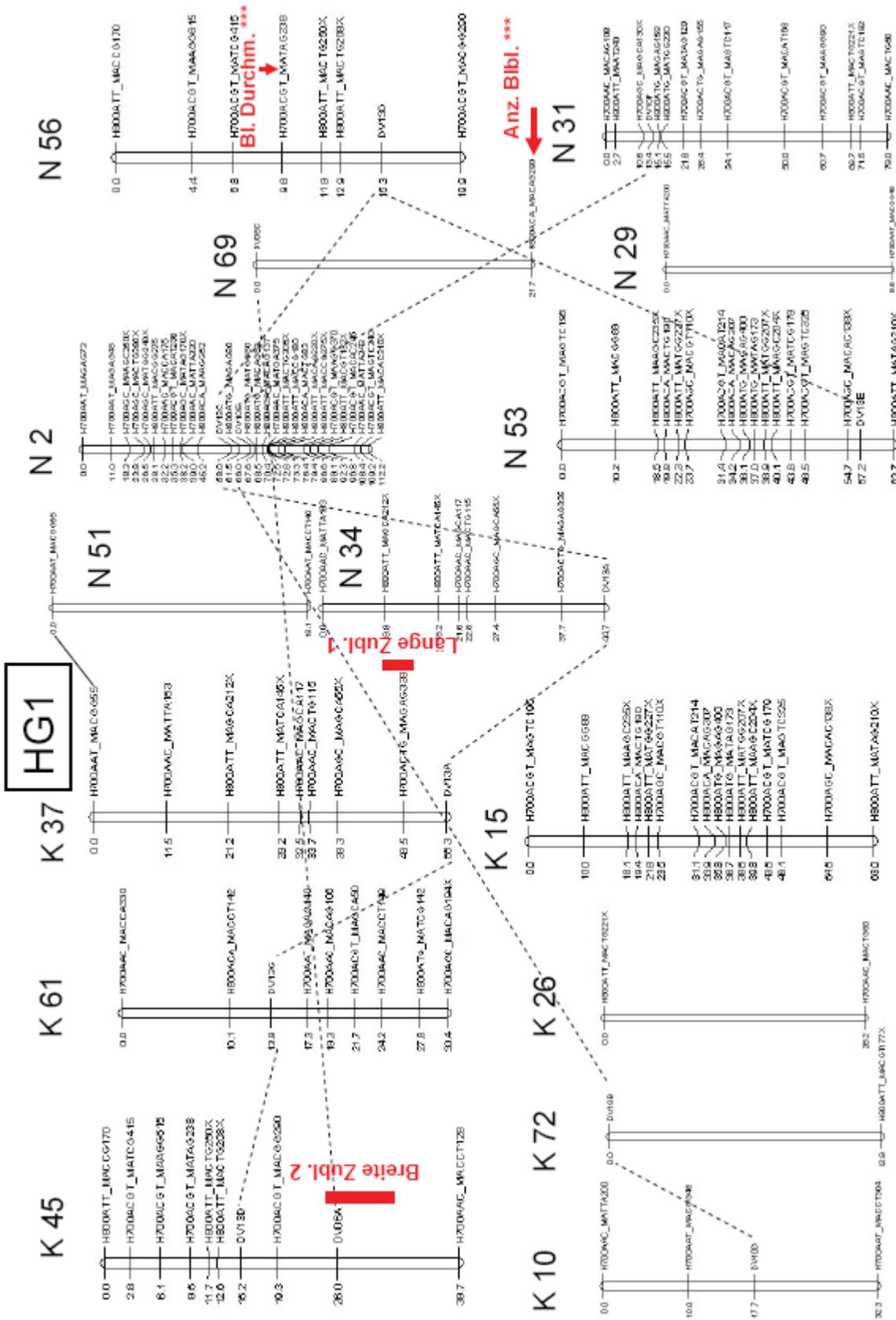
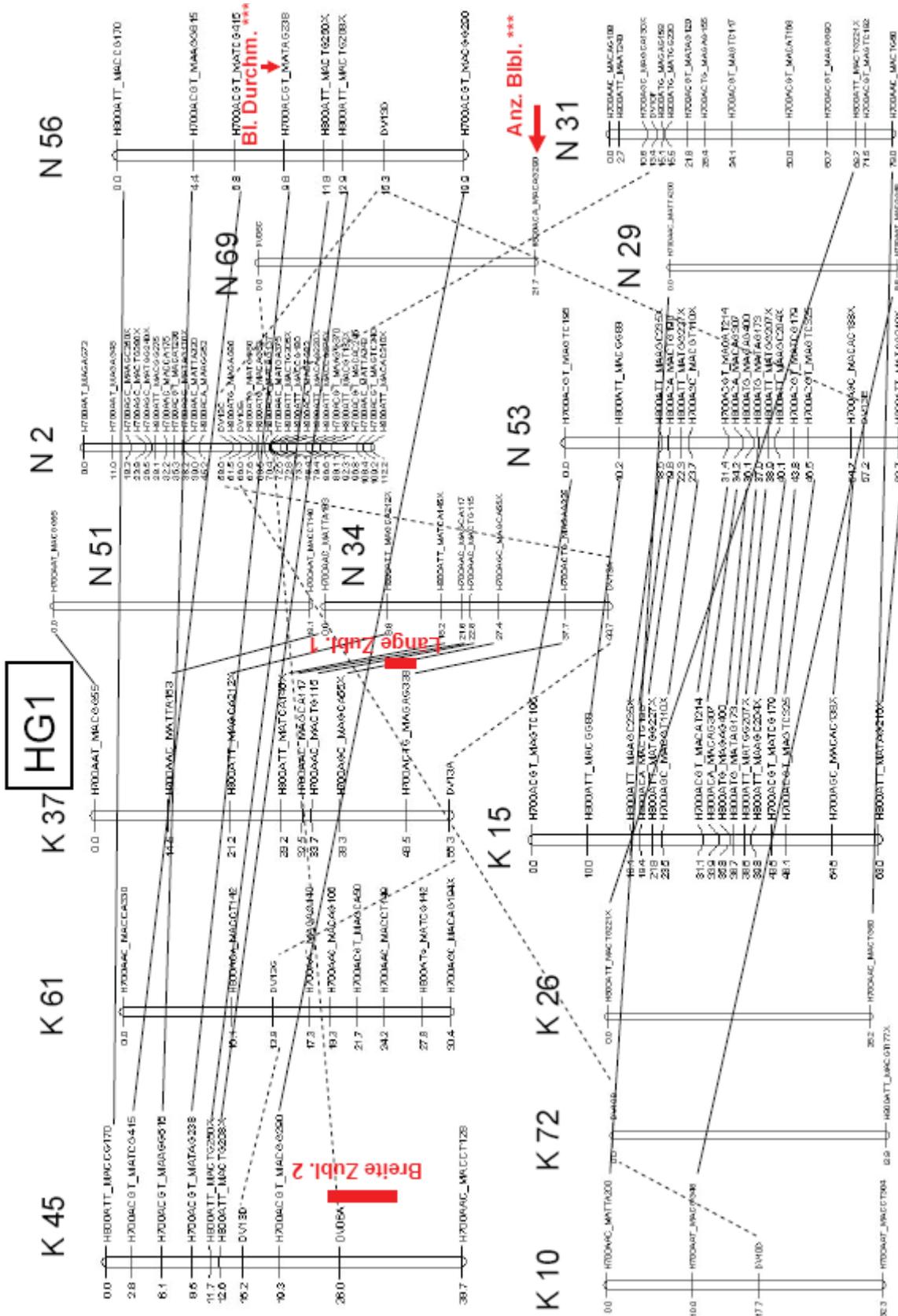
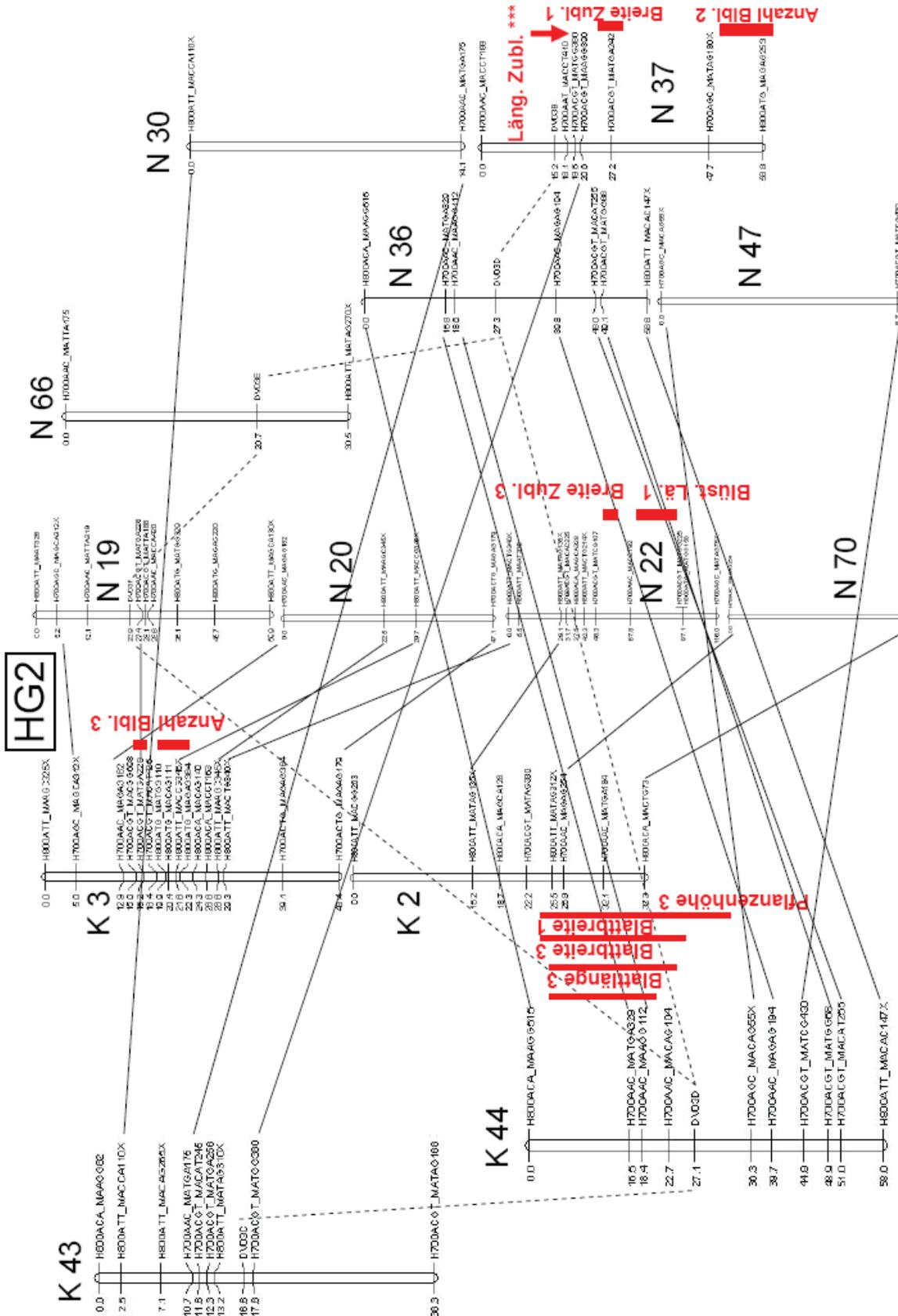


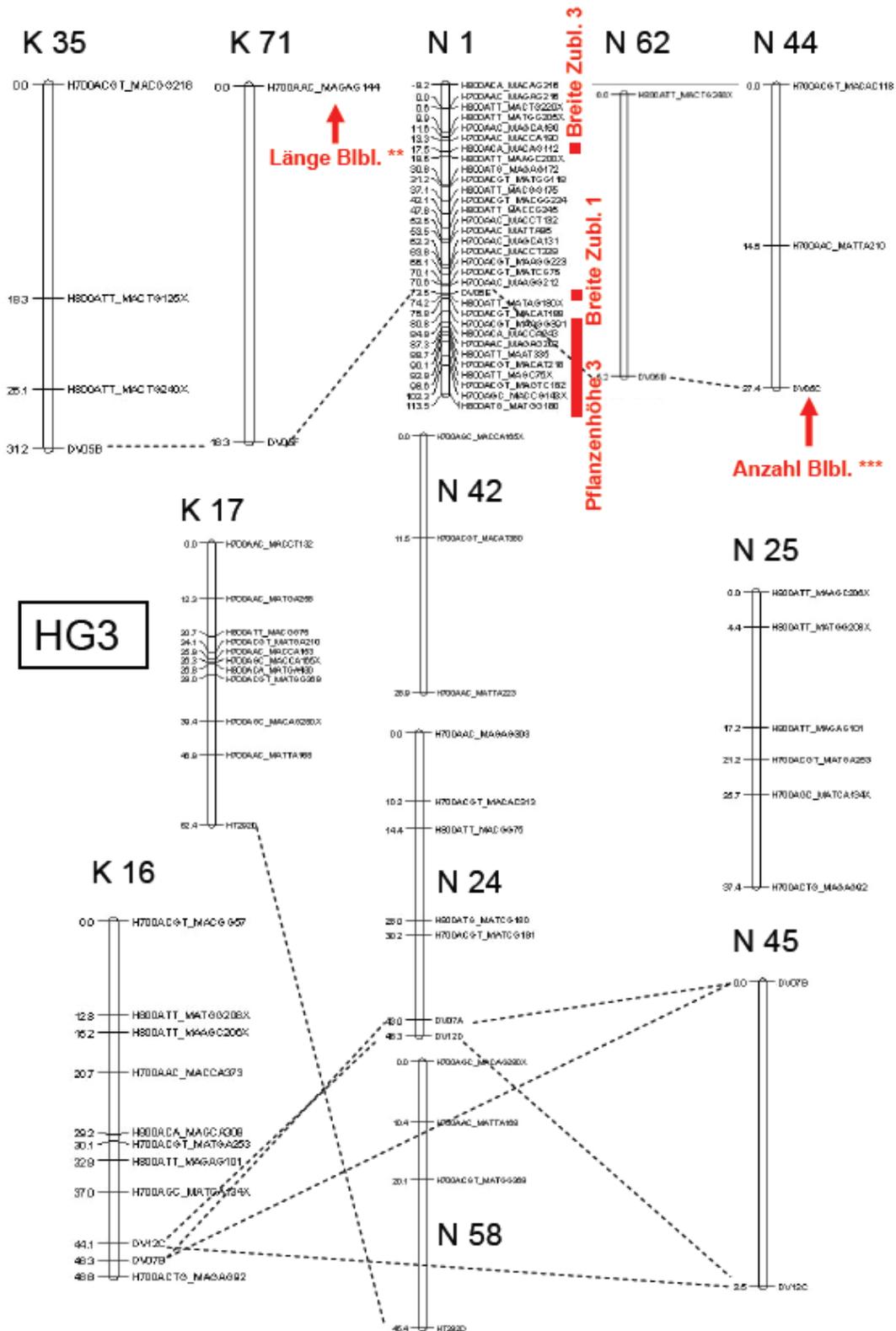
Abbildung 6: Homölogengruppen für die Kartierungseltern Nordlicht und Karneol, Homölogengruppe 1 (HG1). Die gestrichelten Linien verbinden die unterschiedlichen Allele der kartierten Mikrosatellitenmarker. Für Marker, die mit einem roten Pfeil markiert sind, wurde anhand des *Kruskal-Wallis*-Tests eine Assoziation an ein phänotypisches Merkmal nachgewiesen. Die roten Balken rechts neben den KGs markieren die berechneten QTLs. Die Abkürzungen für die Merkmalsbezeichnungen sind in Abbildung 2 erklärt. Die genetischen Distanzen zwischen den kartierten Markern sind in Centimorgan angegeben.



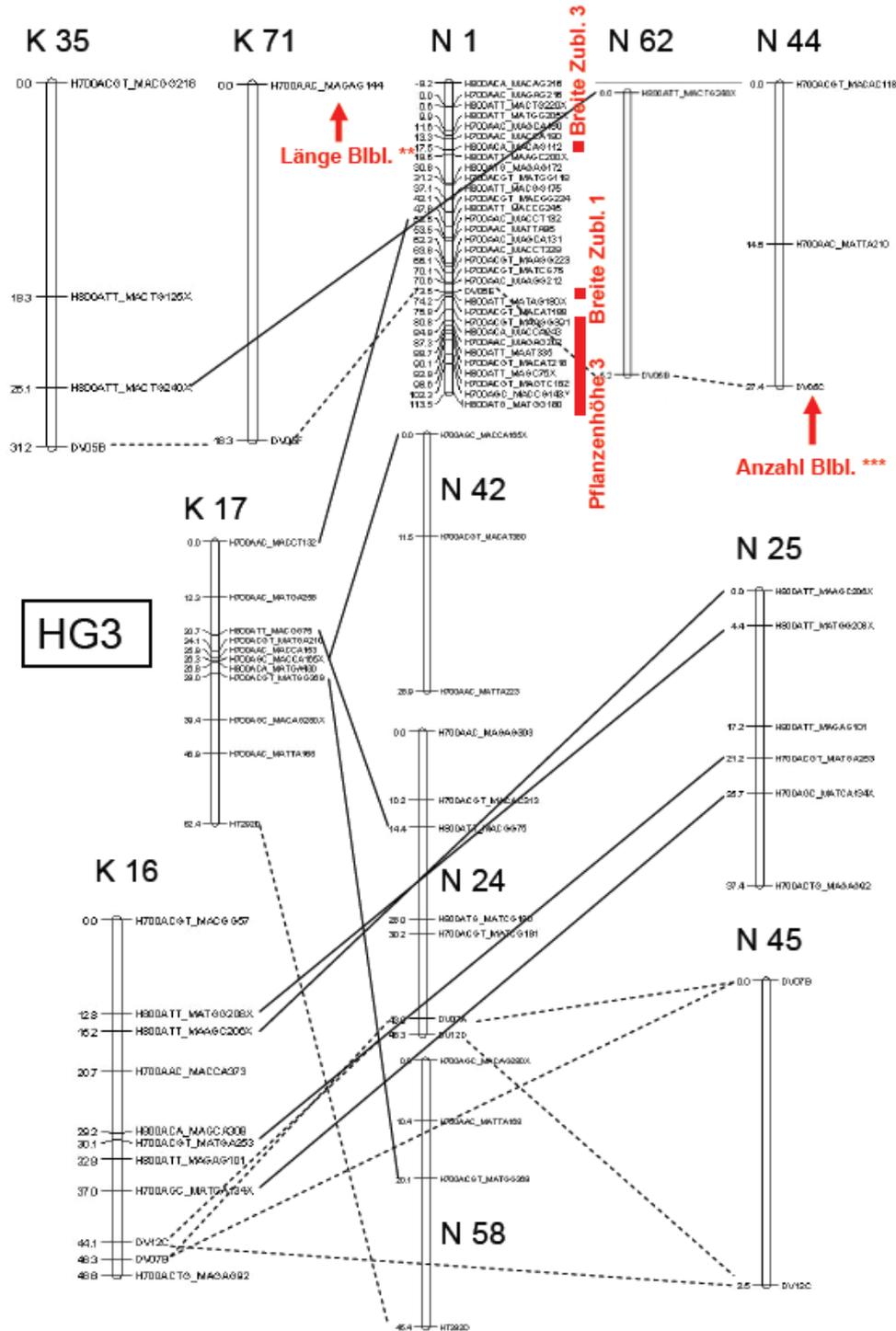
Fortsetzung Abbildung 6: Homölogengruppen für die Kartierungseltern Nordlicht und Karneol, Homölogengruppe 1 (HG1). Die gestrichelten Linien verbinden die unterschiedlichen Allele der kartierten Mikrosatellitenmarker. Die durchgehenden Linien verbinden biparentale AFLP®-Marker. Für Marker, die mit einem roten Pfeil markiert sind, wurde anhand des *Kruskal-Wallis*-Tests eine Assoziation an ein phänotypisches Merkmal nachgewiesen. Die roten Balken rechts neben den KGs markieren die berechneten QTLs. Die Abkürzungen für die Merkmalsbezeichnungen sind in Abbildung 2 erklärt. Die genetischen Distanzen zwischen den kartierten Markern sind in Centimorgan angegeben.



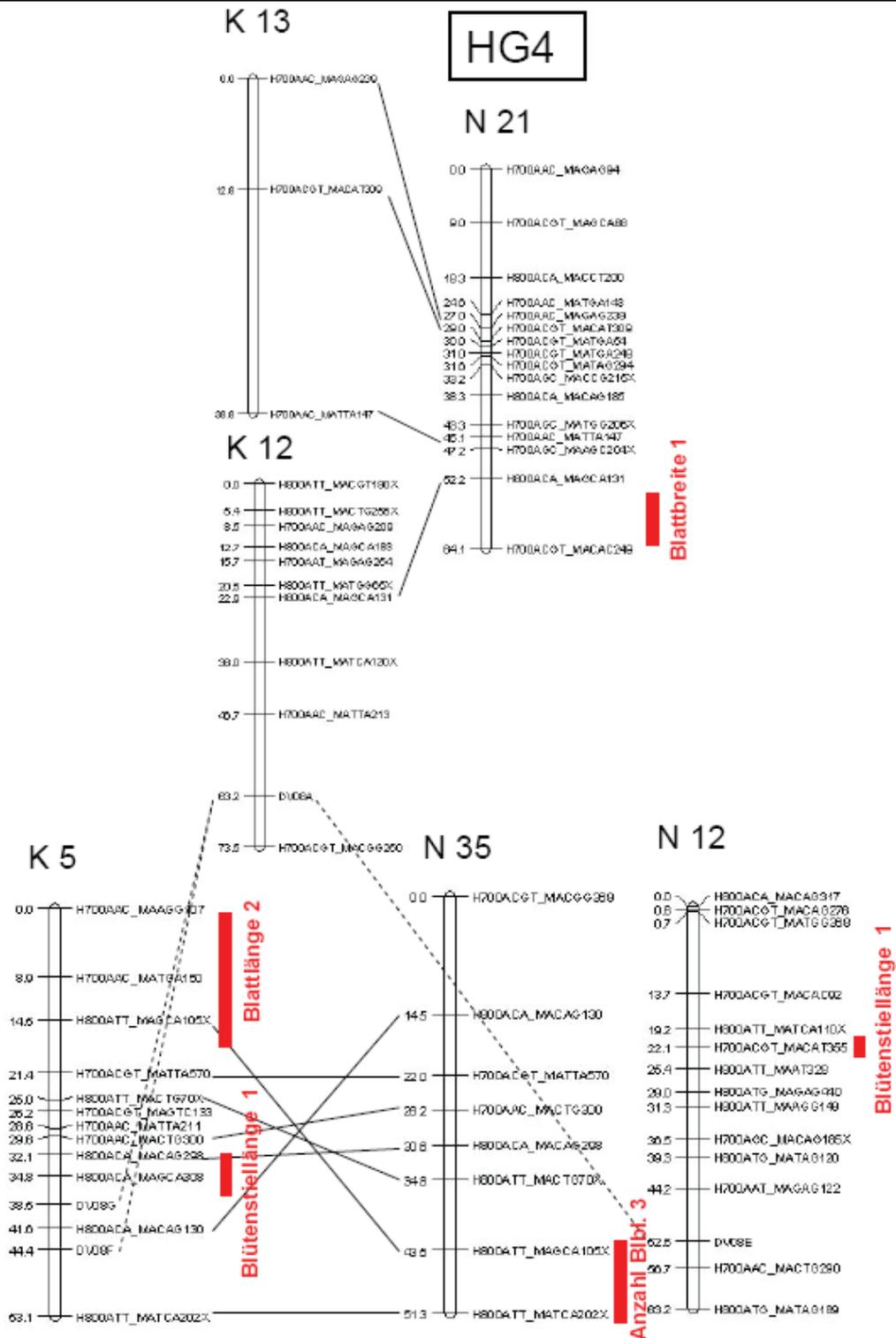
Fortsetzung Abbildung 6: Homölogengruppen für die Kartierenseitern Nordlicht und Karneol, Homölogengruppe 2 (HG2). Die gestrichelten Linien verbinden die unterschiedlichen Allele der kartierten Mikrosatellitenmarker. Die durchgehenden Linien verbinden biparentale AFLP®-Marker. Für Marker, die mit einem roten Pfeil markiert sind, wurde anhand des Kruskal-Wallis-Tests eine Assoziation an ein phänotypisches Merkmal nachgewiesen. Die roten Balken rechts neben den KGs markieren die berechneten Distanzen zwischen den kartierten Markern sind in Centimorgan angegeben. Die genetischen Distanzen zwischen den kartierten Markern sind in Centimorgan angegeben.



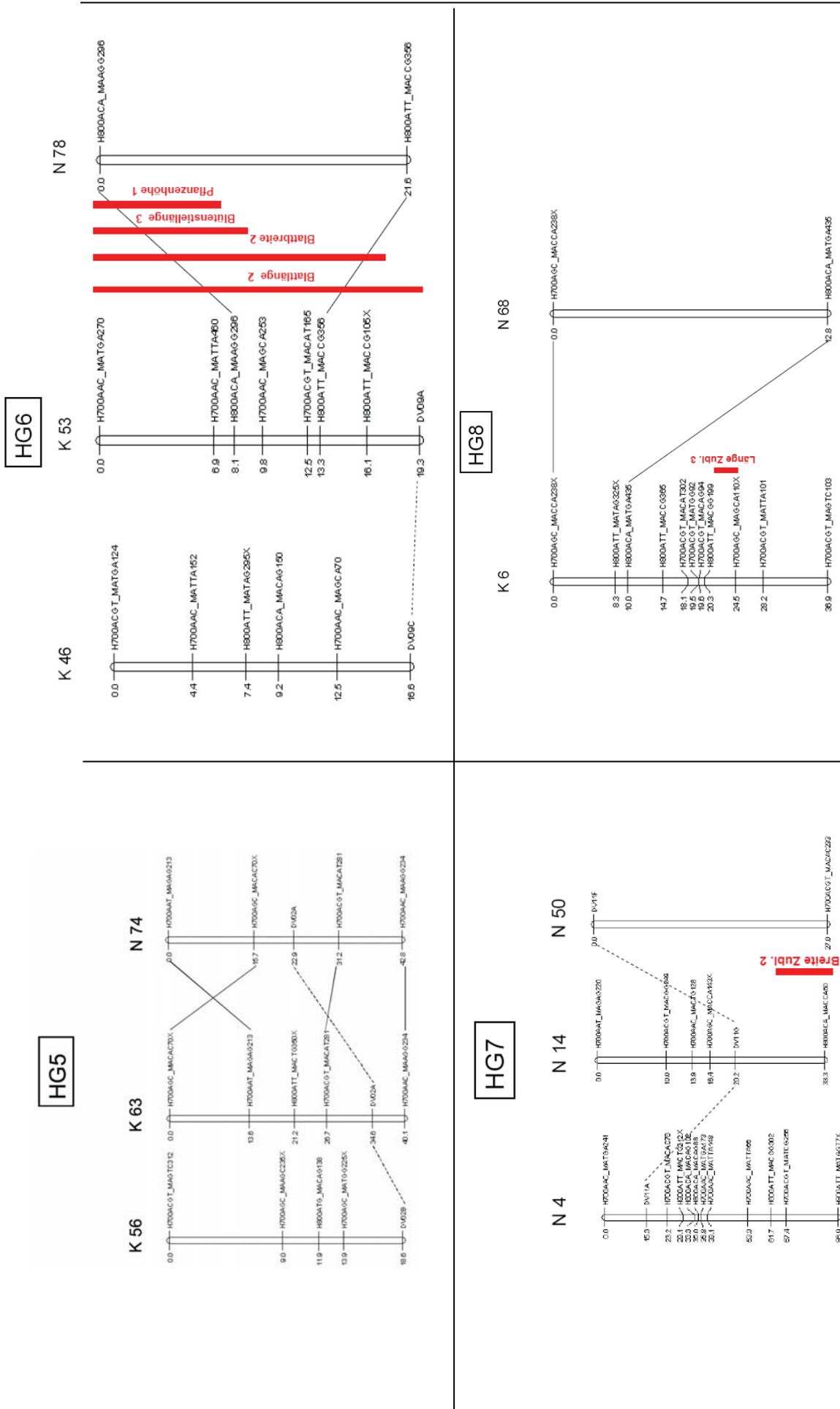
Fortsetzung Abbildung 6: Homöologengruppen für die Kartierungseltern Nordlicht und Karneol, Homöologengruppe 3 (HG3). Die gestrichelten Linien verbinden die unterschiedlichen Allele der kartierten Mikrosatellitenmarker. Für Marker, die mit einem roten Pfeil markiert sind, wurde anhand des *Kruskal-Wallis*-Tests eine Assoziation an ein phänotypisches Merkmal nachgewiesen. Die roten Balken rechts neben den KGs markieren die berechneten QTLs. Die Abkürzungen für die Merkmalsbezeichnungen sind in Abbildung 2 erklärt. Die genetischen Distanzen zwischen den kartierten Markern sind in Centimorgan angegeben.



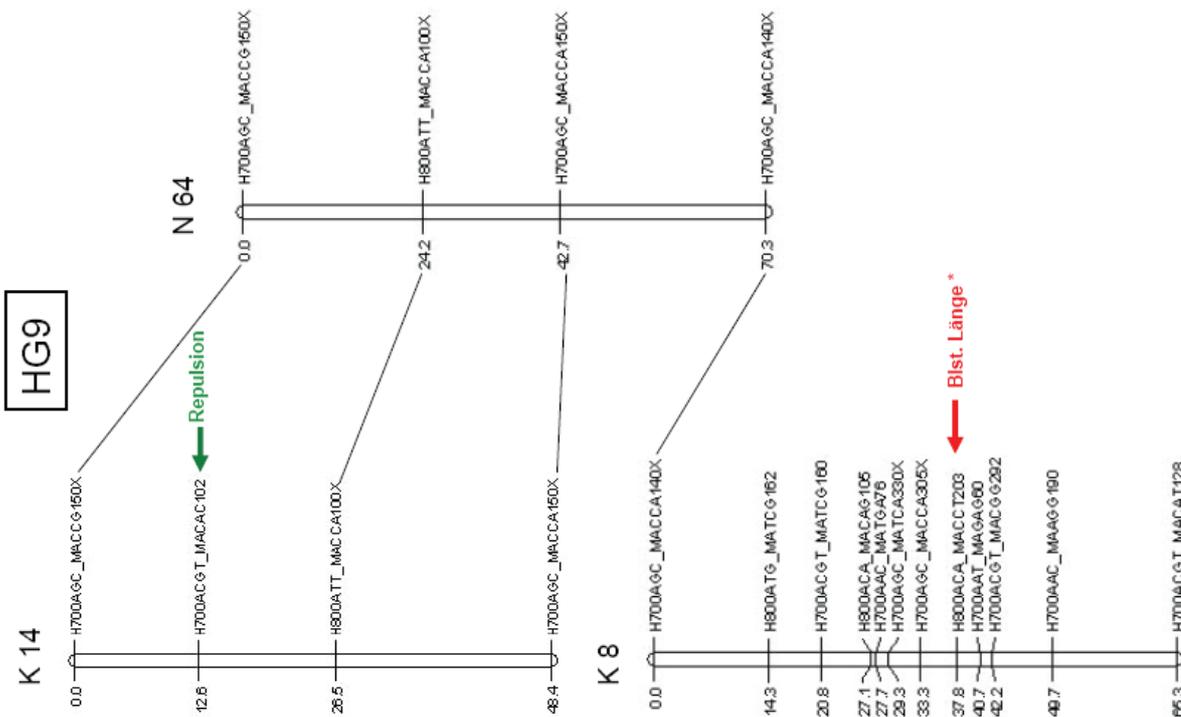
Fortsetzung Abbildung 6: Homologengruppen für die Kartierungseltern Nordlicht und Karneol, Homologengruppe 3 (HG3). Die gestrichelten Linien verbinden die unterschiedlichen Allele der kartierten Mikrosatellitenmarker. Die durchgehenden Linien verbinden biparentale AFLP[®]-Marker. Für Marker, die mit einem roten Pfeil markiert sind, wurde anhand des *Kruskal-Wallis*-Tests eine Assoziation an ein phänotypisches Merkmal nachgewiesen. Die roten Balken rechts neben den KGs markieren die berechneten QTLs. Die Abkürzungen für die Merkmalsbezeichnungen sind in Abbildung 2 erklärt. Die genetischen Distanzen zwischen den kartierten Markern sind in Centimorgan angegeben.



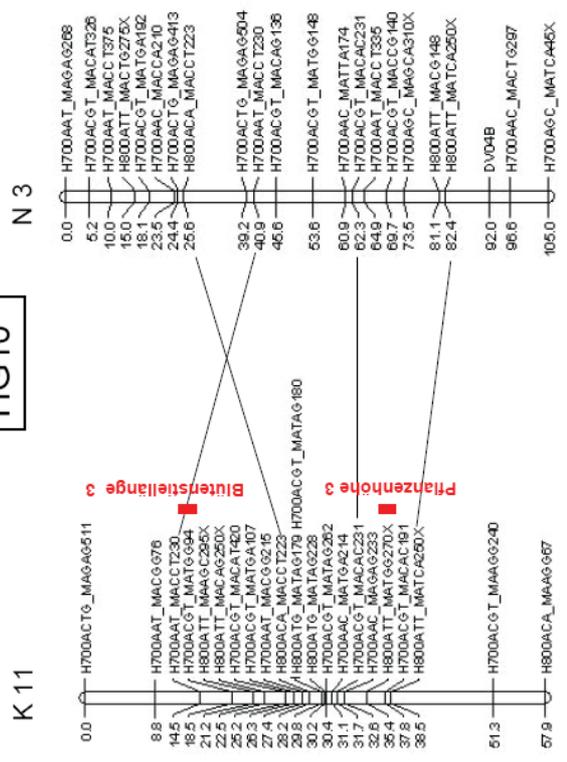
Fortsetzung Abbildung 6: Homöologengruppen für die Kartierungseltern Nordlicht und Karneol, Homöologengruppe 4 (HG4). Die gestrichelten Linien verbinden die unterschiedlichen Allele der kartierten Mikrosatellitenmarker. Die durchgehenden Linien verbinden biparentale AFLP®-Marker. Für Marker, die mit einem roten Pfeil markiert sind, wurde anhand des *Kruskal-Wallis*-Tests eine Assoziation an ein phänotypisches Merkmal nachgewiesen. Die roten Balken rechts neben den KGs markieren die berechneten QTLs. Die Abkürzungen für die Merkmalsbezeichnungen sind in Abbildung 2 erklärt. Die genetischen Distanzen zwischen den kartierten Markern sind in Centimorgan angegeben.



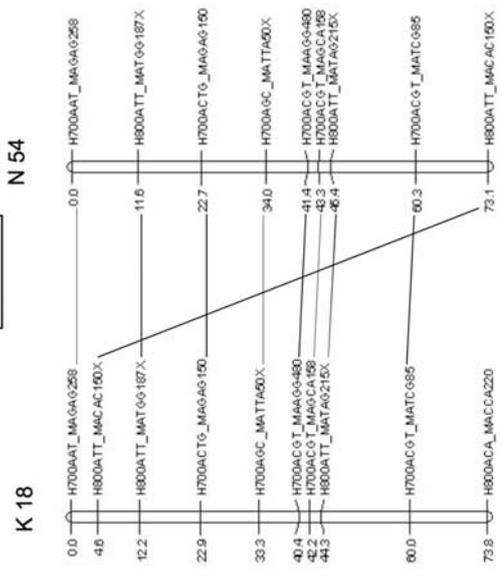
Fortsetzung Abbildung 6: Homöologengruppen 5 bis 8. Die gestrichelten Linien verbinden die unterschiedlichen Allele der kartierten Mikrosatellitenmarker. Die durchgehenden Linien verbinden biparentale AFLP®-Marker. Für Marker, die mit einem roten Pfeil markiert sind, wurde anhand des *Kruskal-Wallis*-Tests eine Assoziation an ein phänotypisches Merkmal nachgewiesen. Die roten Balken rechts neben den KGs markieren die berechneten QTLs. Die Abkürzungen für die Merkmalsbezeichnungen sind in Abbildung 2 erklärt. Die genetischen Distanzen zwischen den kartierten Markern sind in Centimorgan angegeben.



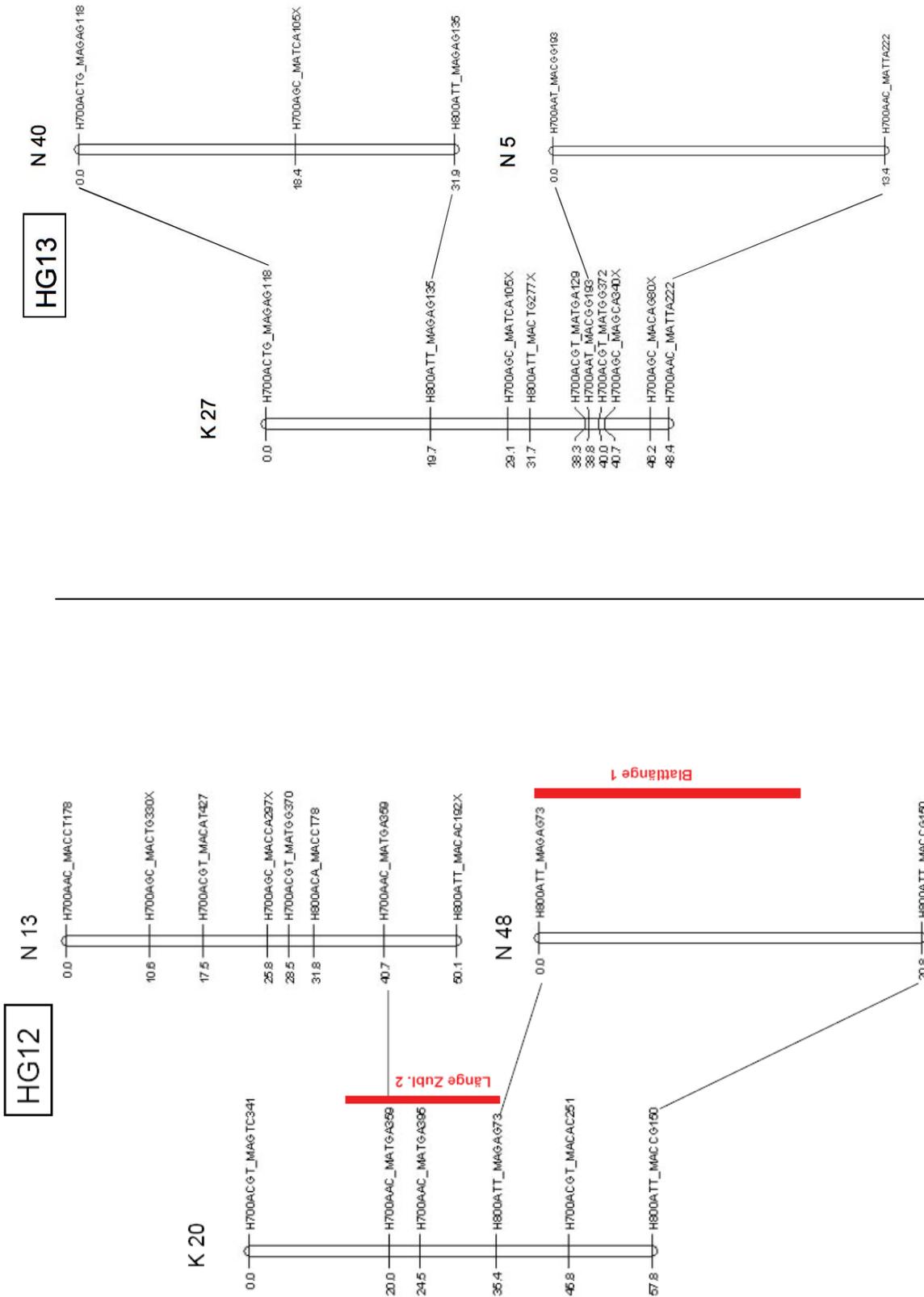
HG10



HG11

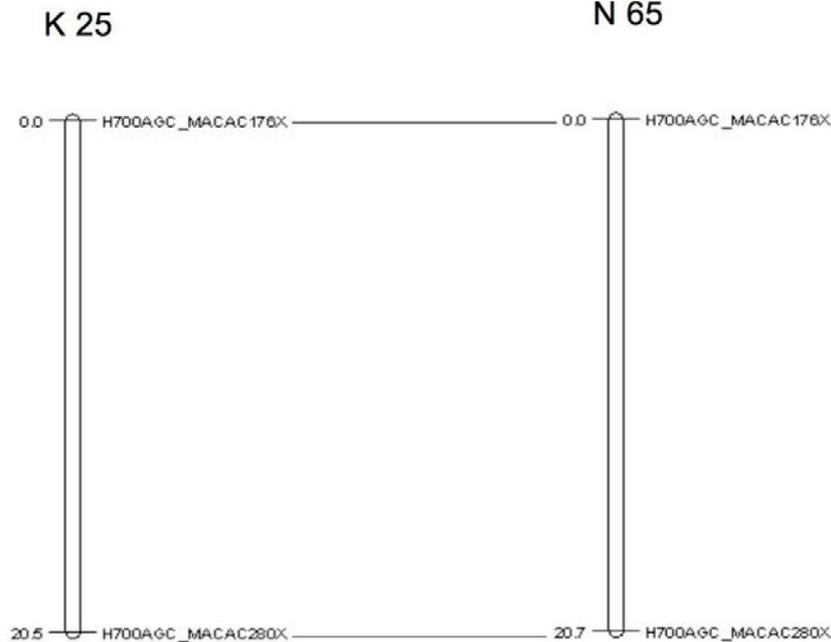


Fortsetzung Abbildung 6: Homöologengruppen 9 bis 11. Die durchgehenden Linien verbinden biparentale AFLP®-Marker. Für Marker, die mit einem roten Pfeil markiert sind, wurde anhand des *Kruskal-Wallis*-Tests eine Assoziation an ein phänotypisches Merkmal nachgewiesen. Die roten Balken rechts neben den KGs markieren die berechneten QTLs. Der grüne Pfeil zeigt einen Marker, der in der Repulsionsphase gekoppelt ist. Die Abkürzungen für die Merkmalsbezeichnungen sind in Abbildung 2 erklärt. Die genetischen Distanzen zwischen den kartierten Markern sind in Centimorgan angegeben.

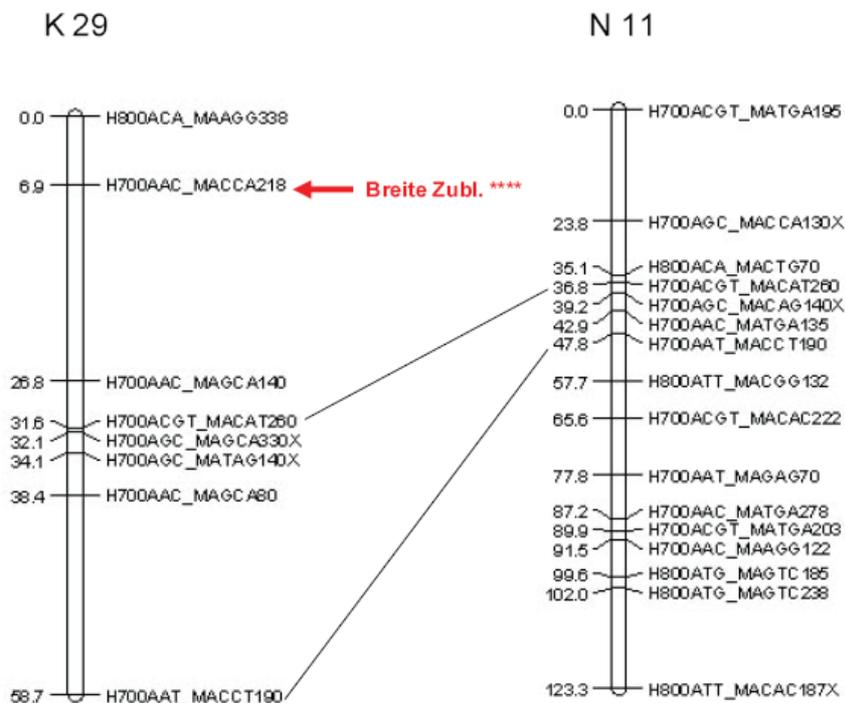


Fortsetzung Abbildung 6: Homöologengruppen 12 und 13. Die durchgehenden Linien verbinden biparentale AFLP®-Marker. Für Marker, die mit einem roten Pfeil markiert sind, wurde anhand des *Kruskal-Wallis*-Tests eine Assoziation an ein phänotypisches Merkmal nachgewiesen. Die roten Balken rechts neben den KGs markieren die berechneten QTLs. Die Abkürzungen für die Merkmalsbezeichnungen sind in Abbildung 2 erklärt. Die genetischen Distanzen zwischen den kartierten Markern sind in Centimorgan angegeben.

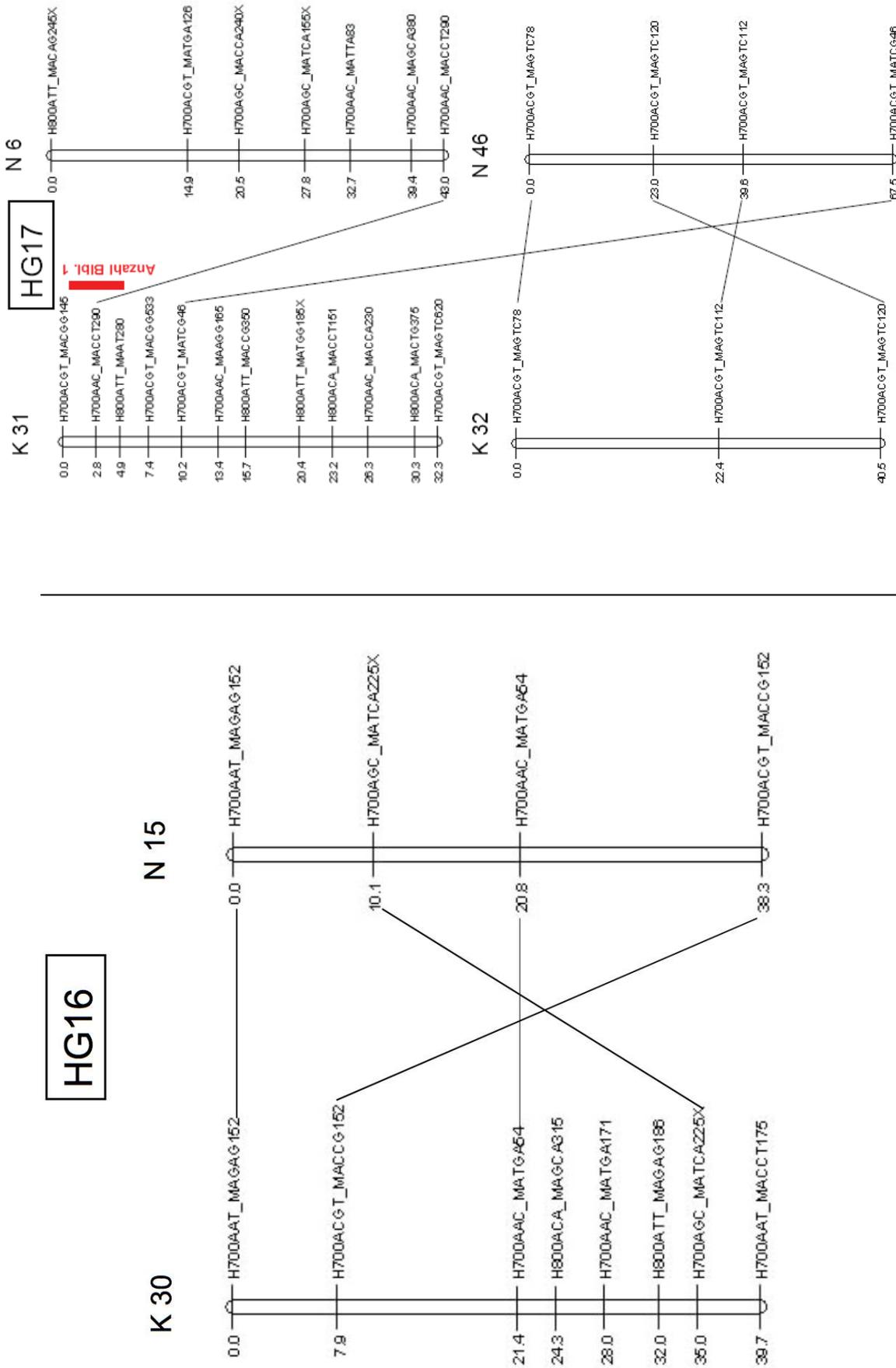
HG14



HG15

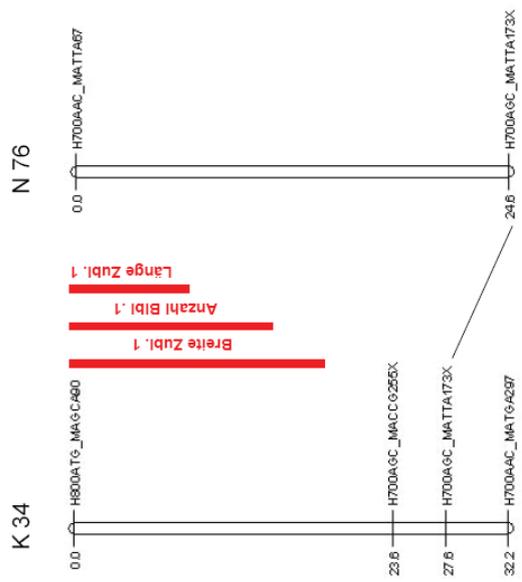


Fortsetzung Abbildung 6: Homöologengruppen 14 und 15. Die durchgehenden Linien verbinden biparentale AFLP®-Marker. Für Marker, die mit einem roten Pfeil markiert sind, wurde anhand des *Kruskal-Wallis*-Tests eine Assoziation an ein phänotypisches Merkmal nachgewiesen. Die Abkürzungen für die Merkmalsbezeichnungen sind in Abbildung 2 erklärt. Die genetischen Distanzen zwischen den kartierten Markern sind in Centimorgan angegeben.

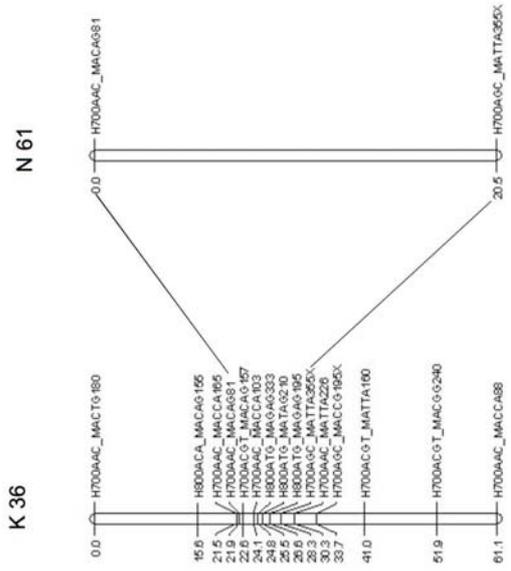


Fortsetzung Abbildung 6: Homöologengruppen 16 und 17. Die durchgehenden Linien verbinden biparentale AFLP®-Marker. Die roten Balken rechts neben den KGs markieren die berechneten QTLs. Die Abkürzungen für die Merkmalsbezeichnungen sind in Abbildung 2 erklärt. Die genetischen Distanzen zwischen den kartierten Markern sind in Centimorgan angegeben.

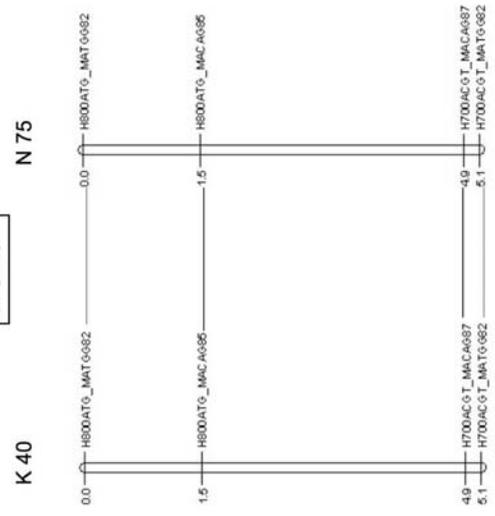
HG18



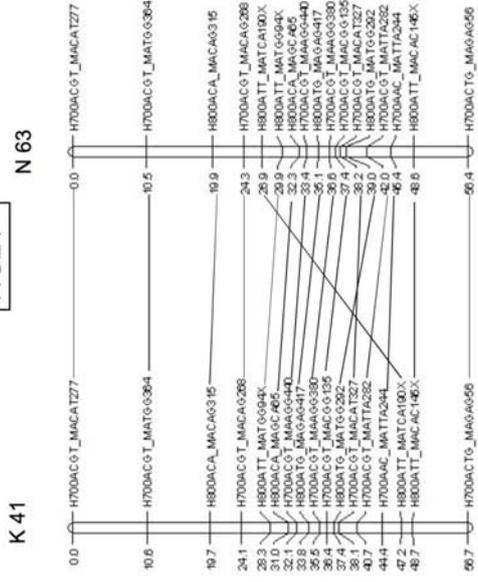
HG19



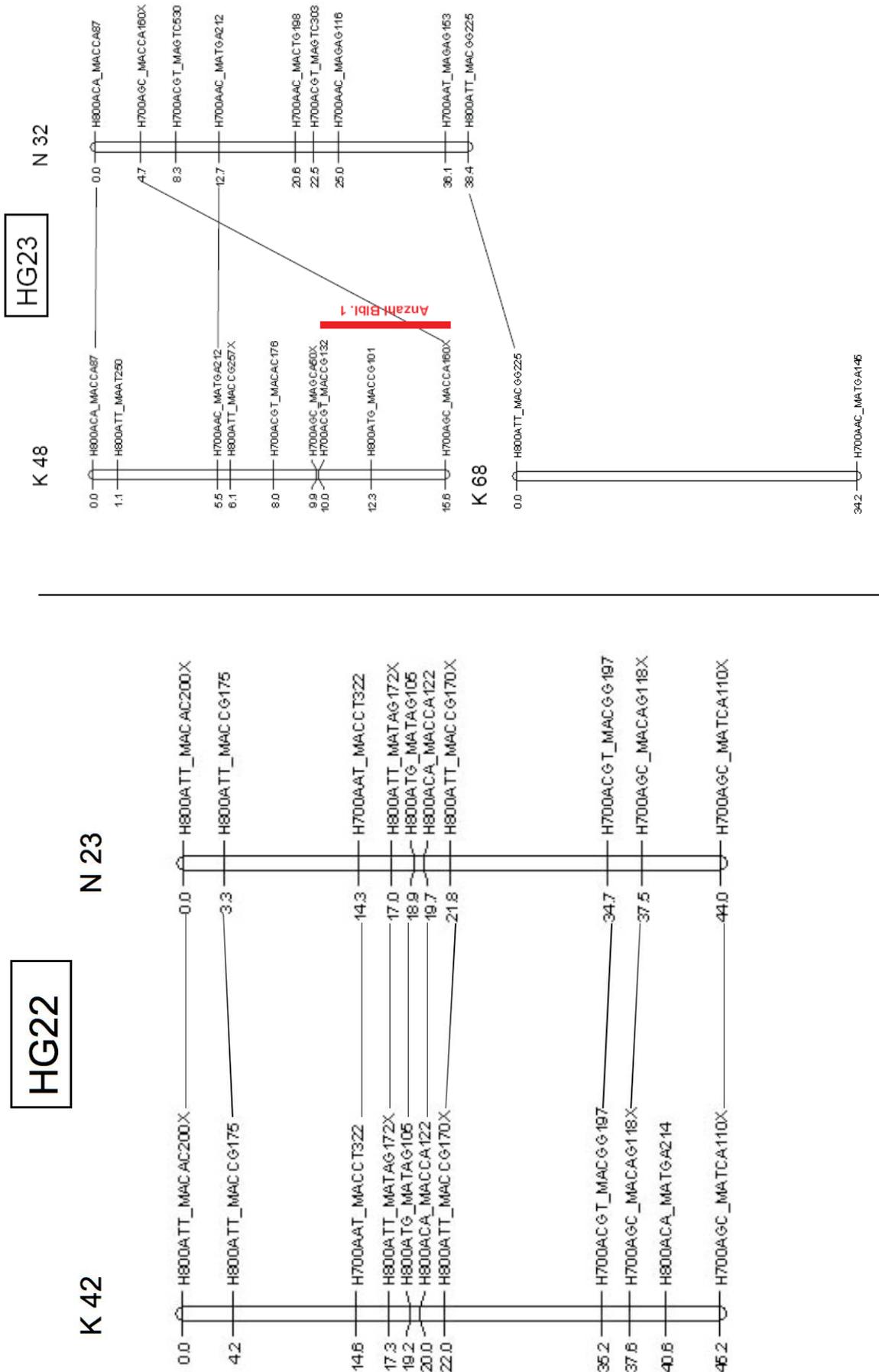
HG20



HG21



Fortsetzung Abbildung 6: Homöologengruppen 18, 19, 20 und 21. Die durchgehenden Linien verbinden biparentale AFLP®-Marker. Die roten Balken rechts neben den KGs markieren die berechneten QTLs. Die Abkürzungen für die Merkmalsbezeichnungen sind in Abbildung 2 erklärt. Die genetischen Distanzen zwischen den kartierten Markern sind in Centimorgan angegeben.



Fortsetzung Abbildung 6: Homöologengruppen 22 und 23. Die durchgehenden Linien verbinden biparentale AFLP®-Marker. Die roten Balken rechts neben den KGs markieren die berechneten QTLs. Die Abkürzungen für die Merkmalsbezeichnungen sind in Abbildung 2 erklärt. Die genetischen Distanzen zwischen den kartierten Markern sind in Centimorgan angegeben.

3.3.4 Beschreibung der Homöologengruppen

Die Homöologengruppe 1 besteht aus den 15 KGs K10, K15, K26, K37, K45, K61, K72, N2, N29, N31, N34, N51, N53, N56 und N69, die durch die drei Mikrosatellitenmarker DV06, DV10 und DV13 verbunden wurden. Jeweils ein Allel des Mikrosatellitenmarkers DV13 wurde für Karneol auf den KGs K37, K45 und K61 kartiert. Für Nordlicht wurden insgesamt vier Allele dieses Markers, verteilt über die KGs N2, N34, N53 und N56, lokalisiert. Lediglich ein Allel des Mikrosatellitenmarkers DV06 wurde für jeden Kartierungselter auf den KGs K45 und N69 kartiert. Jeweils zwei Allele des Markers DV10 wurden für die beiden Kartierungseltern, verteilt über die KGs K10, K72, N2 und N31, lokalisiert.

Die KGs K15, K26, N29 und N51 konnten der Homöologengruppe 1 anhand von biparentalen AFLP[®]-Markern hinzugefügt werden. Dabei konnten die KGs N34 und N51 durch die Verknüpfung mit der KG K37 in entsprechender Reihenfolge zueinander angeordnet werden.

Die KG der Kartierungsmutter Karneol mit der höchsten Markerdichte in der Homöologengruppe 1 ist die KG K15 mit 16 Markern, die verteilt über 63 cM kartiert wurden. Die KGs K26 und K72 weisen hingegen jeweils lediglich zwei Marker mit den Abständen 12,9 bzw. 26,2 cM auf.

Die väterliche KG mit der höchsten Markerdichte ist die KG N2 mit 29 Markern, die verteilt über 112,2 cM kartiert wurden. Im Gegensatz dazu weisen die übrigen KGs für Nordlicht eine teilweise wesentlich geringere Markerdichte auf. So wurden auf den KGs N29, N51 und N69 jeweils lediglich zwei Marker in Distanzen zwischen 9,6 und 21,7 cM kartiert.

Der Homöologengruppe 2 wurden die 13 KGs K2, K3, K43, K44, N19, N20, N22, N30, N36, N37, N47, N66 und N70 zugewiesen. Diese Homöologengruppe wurde zunächst anhand des Mikrosatellitenmarkers DV03 identifiziert. Für die Kartierungsmutter Karneol wurde jeweils ein Allel dieses Markers auf den KGs K43 und K44 kartiert. Die übrigen vier Allele des Markers DV03 wurden für Nordlicht, verteilt über die KGs N19, N36, N37 und N66, lokalisiert.

Die verbliebenen sieben KGs K2, K3, N20, N22, N30, N47 und N70 wurden in die Homöologengruppe 2 anhand von biparentalen AFLP[®]-Markern eingeordnet. Dadurch konnten die KGs K2 und K3 zu den KGs N19, N20, N22 und N70 in

entsprechender Orientierung angeordnet werden. Die KGs N36 und N47 wurden durch die Verknüpfung mit der KG K44 zueinander in der richtigen Reihenfolge dargestellt. Die KGs N30 und N37 wurden mit der KG K43 anhand der biparentalen AFLP[®]-Marker verbunden und konnten so in einander entsprechender Abfolge angeordnet werden.

Die kartierten Marker sind auf den mütterlichen KGs innerhalb der Homöologengruppe 2 relativ gleichmäßig verteilt. Die KGs des Kartierungsvaters Nordlicht in der Homöologengruppe 2 weisen hingegen eine relativ geringe Abdeckung auf. Die KGs N30, N47, N66 und N70 wurden beispielsweise jeweils lediglich durch zwei bis drei Marker abgedeckt.

Der Homöologengruppe 3 wurden die zwölf KGs K16, K17, K35, K71, N1, N24, N25, N42, N44, N55, N58 und N62 zugewiesen. Dies erfolgte zunächst durch die vier Mikrosatellitenmarker DV05, DV07, DV12 und HT292. Die Allele des Markers DV05 wurden verteilt über die KGs K71, N1 und N44 kartiert. Für die beiden Mikrosatellitenmarker DV07 und DV12 wurde je ein Allel auf den KGs K16, N24, N45 lokalisiert. Jeweils ein Allel des Markers HT292 wurde auf den KGs K17 und N58 kartiert.

Die KGs N25 und N42 wurden der Homöologengruppe 3 anhand biparentaler AFLP[®]-Marker zugeordnet. Dadurch konnten die KGs N1, N24, N42 und N58 zu der KG K17 in entsprechender Abfolge angeordnet werden.

Auf der väterlichen KG N1 wurden mit insgesamt 32 Markern, verteilt über 122,7 cM, eine relativ hohe Anzahl an Markern recht eng aneinander kartiert. Außerdem wurden auf dieser KG insgesamt drei QTLs, einer für die Pflanzenhöhe (Umwelt 3) und zwei für die Breite der Zungenblüten (Umwelt 1 und 3), lokalisiert. Die väterlichen KGs N42, N44, N45 und N62 weisen im Gegensatz zur KG N1 mit jeweils lediglich zwei bis drei Markern eine wesentlich geringere Markerabdeckung auf.

Die Homöologengruppe 4 besteht aus den sechs KGs K5, K12, K13, N12, N21 und N35. Für den Marker DV08 wurden zwei Allele auf der KG K5 und jeweils ein Allel auf den KGs K12 und N12 kartiert. Die KGs K13, N21 und N35 wurden dieser Homöologengruppe durch die Verknüpfung der kartierten biparentalen AFLP[®]-Marker hinzugefügt. Dabei konnten die KGs K12 und K13 zu der KG N21 in einander entsprechender Orientierung dargestellt werden.

Die Homöologengruppe 5, bestehend aus den KGs K56, K63 und N74, wurde durch die drei Allele des Mikrosatellitenmarkers DV02 identifiziert. Für alle drei KGs wurde jeweils ein Allel dieses Markers kartiert. Die Verknüpfung zwischen den KGs K63 und N74 wurde zusätzlich durch biparentale AFLP[®]-Singledosemarker bestätigt, die auf diesen beiden KGs lokalisiert wurden.

Die Homöologengruppe 6 wurde anhand des Mikrosatellitenmarkers DV09 identifiziert. Durch diesen Marker wurden die beiden mütterlichen KGs K46 und K53, auf der vier überlappende QTLs für die vier Merkmale Blattlänge (Umwelt 2), Blattbreite (Umwelt 2), Blütenstängellänge (Umwelt 3) und Pflanzenhöhe (Umwelt 1) lokalisiert wurden, verbunden. Die väterliche KG N78 wurde mit der mütterlichen KG K53 durch biparentale AFLP[®]-Singledosemarker verknüpft.

Die Homöologengruppe 7 wurde ausschließlich auf Basis des Mikrosatellitenmarkers DV11 identifiziert. Anhand dieses Markers konnten jedoch lediglich die drei paternalen KGs N4, N14 und N50 in eine Gruppe zusammengefasst werden.

In den übrigen Homöologengruppen 8 bis 29 wurden jeweils maximal zwei KGs je Elter mit denen des anderen Kartierungselters anhand von biparentalen AFLP[®]-Singledosemarkern verbunden. Die KGs der Homöologengruppen 14, 20, 21, 22, 25 und 28 bestehen jeweils ausschließlich aus biparentalen AFLP[®]-Singledosemarkern, die größtenteils zwischen beiden Eltern in der gleichen Reihenfolge angeordnet wurden. Die Abbildungen aller KGs und Homöologengruppen sind zusätzlich noch einmal auf der im Anhang beiliegenden CD hinterlegt.

3.4 Assoziationen molekularer Marker an phänotypische Merkmale von *Dahlia variabilis*

In der Population K5 wurden 22 phänotypische Merkmale in drei Umwelten (Umwelt 1 = Herrenhausen 2009, Umwelt 2 = Herrenhausen 2010, Umwelt 3 = Ruthe 2010) gemessen (siehe 2.3, Tabelle 2). Anhand dieser Daten wurde mit der Software MapQTL 6 (Van Ooijen 2009) ein *Kruskal-Wallis*-Test, ein Permutationstest und ein Interval Mapping durchgeführt. Auf diese Weise sollten Marker bzw. QTLs identifiziert werden, die signifikante Assoziationen an die erhobenen Merkmale aufweisen. Die

Boniturdaten für die Population K5 sowie die MapQTL-Dateien der durchgeführten Analysen der Marker-Merkmalsassoziationen sind auf der CD im Anhang hinterlegt.

3.4.1 *Kruskal-Wallis-Test*

Anhand des *Kruskal-Wallis-Tests* wurden die kartierten Marker einzeln auf Korrelationen an die Merkmale, die für die Population K5 gemessen wurden, untersucht. Die Marker, für welche eine Assoziation an ein Merkmal in allen drei Umwelten nachgewiesen werden konnte, wurden in den Kopplungskarten in den Abbildungen 4 bis 6 (siehe Kapitel 3.3.1 bis 3.3.3) mit einem roten Pfeil und der entsprechenden Merkmalsabkürzung gekennzeichnet. Es wurde stets das niedrigste Signifikanzniveau des jeweiligen Markers angegeben, das in einer der drei Umwelten angenommen wurde. Eine detaillierte Darstellung der Ergebnisse des *Kruskal-Wallis-Tests* ist in Chaudhary (2011) aufgeführt. Diese Master-of-Science-Arbeit ist auf der CD im Anhang hinterlegt. Die Marker für die anhand des *Kruskal-Wallis-Tests* für die Kartierungsmutter Karneol signifikante Markerassoziationen über alle drei untersuchten Umwelten nachgewiesen wurden, sind in der folgenden Tabelle 13 zusammengefasst.

Tabelle 13: Signifikante Marker-Merkmalsassoziationen für die Kartierungsmutter Karneol, die in allen drei Umwelten anhand des *Kruskal-Wallis-Tests* nachgewiesen wurden

Merkmal	Marker	SN ¹	KG ²	HG ³
Blütenstängellänge	H800ACA_MACCT203	*	K8	9
Blütenstandsdurchmesser	H800ACA_MACCA92	****	K52	26
	H700AAT_MAGAG265	**	K52	26
	H700ACGT_MAGCA180	**	K4	NA ⁴
Länge Zungenblüten	H700AAC_MAGAG144	**	K71	3
Breite Zungenblüten	H700AAC_MACCA218	****	K29	15
Anzahl Blütenblätter	H700ACGT_MATGA131	****	K1	NA
	H800AAT_MACGG294	**	K28	NA

1 = Signifikanzniveau: * Signifikant bei $P < 0.05$; ** Signifikant bei $P < 0.01$; *** Signifikant bei $P < 0.001$; **** Signifikant bei $P < 0.0001$

2 = Kopplungsgruppe; 3 = Homöologengruppe; 4 = Kopplungsgruppe ist keiner Homöologengruppe zugeordnet

Anhand des *Kruskal-Wallis-Tests* konnte für die Kartierungsmutter Karneol für insgesamt fünf Merkmale Korrelationen an acht Marker über alle drei Umwelten ermittelt werden. Für die drei Merkmale Blütenstiellänge (auf der KG K8), Länge der

Zungenblüten (auf der KG K71) und Breite der Zungenblüten (auf der KG K29) konnte jeweils ein Marker mit einer signifikanten Assoziation an eines dieser Merkmale nachgewiesen werden. Für den Blütenstandsdurchmesser wurden Korrelationen an die drei Marker H700AAT_MAGAG265, H800ACA_MACCA92 und H700ACGT_MAGCA180 ermittelt. Von diesen drei Markern befinden sich zwei auf der KG K52 mit einem Abstand von 4,7 cM. Der dritte Marker ist auf der KG K4 lokalisiert. Die beiden Marker H700ACGT_MATGA131 und H800AAT_MACGG294, die Assoziationen an die Anzahl der Blütenblätter aufweisen, wurden auf den KGs K1 und K28 kartiert.

Für den Kartierungsvater Nordlicht konnten anhand des *Kruskal-Wallis*-Tests für drei unterschiedliche Merkmale insgesamt fünf signifikante Markerassoziationen über alle drei Umwelten nachgewiesen werden. Diese sind in der nachfolgenden Tabelle 14 aufgelistet.

Tabelle 14: Signifikante Marker-Merkmalsassoziationen für den Kartierungsvater Nordlicht, die in allen drei Umwelten anhand des *Kruskal-Wallis*-Tests nachgewiesen wurden

Merkmal	Marker	SN ¹	KG ²	HG ³
Blütenstandsdurchmesser	H700ACGT_MATCG415	***	N56	1
Länge Zungenblüten	H700ACGT_MATGG390	***	N37	2
	H700ACGT_MACGG122	****	N39	NA ⁴
Anzahl Blütenblätter	H800ACA_MACAG290	***	N69	1
	DV05C	***	N44	3

1 = Signifikanzniveau: * Signifikant bei $P < 0.05$; ** Signifikant bei $P < 0.01$; *** Signifikant bei $P < 0.001$; **** Signifikant bei $P < 0.0001$

2 = Kopplungsgruppe; 3 = Homöologengruppe; 4 = Kopplungsgruppe ist keiner Homöologengruppe zugeordnet

Für Nordlicht wurde für den Marker H700ACGT_MATCG415 auf der KG N56 eine Korrelation an den Blütenstandsdurchmesser detektiert. Die beiden Marker H700ACGT_MATGG390 und H700ACGT_MACGG122, für die eine Assoziation an die Länge der Zungenblüten nachgewiesen werden konnte, befinden sich auf den KGs N37 bzw. N39. Die beiden Marker H800ACA_MACAG290 und DV05C, die eine Assoziation an die Anzahl der Blütenblätter aufweisen, wurden auf den KGs N44 und N69 kartiert. Für die übrigen Allele des Mikrosatellitenmarkers DV05 konnten jedoch keine Korrelationen an die Anzahl der Blütenblätter nachgewiesen werden.

Anhand des *Kruskal-Wallis*-Tests konnten übereinstimmend für beide Kartierungseltern Korrelationen über alle drei Umwelten zwischen den angewendeten Markern und folgenden Merkmalen nachgewiesen werden:

- Blütenstandsdurchmesser (drei Marker für Karneol, ein Marker für Nordlicht)
- Länge der Zungenblüten (ein Marker für Karneol, zwei Marker für Nordlicht)
- Anzahl der Blütenblätter (zwei Marker für jeden Kartierungselter)

Für die Merkmale Blütenstängellänge und Breite der Zungenblüten konnte lediglich für die Kartierungsmutter Karneol jeweils eine Markerassoziation über alle drei Umwelten gezeigt werden.

3.4.2 QTL-Kartierung

Im Gegensatz zum *Kruskal-Wallis*-Test werden beim Interval Mapping die Bereiche zwischen den kartierten Markern ebenfalls auf Assoziationen an die Merkmale geprüft mit deren Daten sie verrechnet werden. Zuvor wurde ein Permutationstest durchgeführt, um für die unterschiedlichen KGs die jeweilige Detektionsschwelle zu ermitteln, ab der die Assoziationen als signifikant angenommen wurden. Die Regionen, für welche anhand des Interval Mappings ein Einfluss auf eines der bonitierten Merkmale nachgewiesen wurde, sind in den Abbildungen 4 bis 6 durch einen roten Balken rechts neben der entsprechenden KG gekennzeichnet. Die Zahlen hinter den Merkmalsbezeichnungen zeigen die Umwelt, für welche die Markerassoziationen an das entsprechende Merkmal nachgewiesen wurde (1 = Herrenhausen 2009, 2 = Herrenhausen 2010, 3 = Ruthe 2010). Die Abkürzungen für die unterschiedlichen Merkmale sind in der Legende für die Kopplungskarten (siehe 3.3.1, Abbildung 3) erläutert. Die Merkmale, für welche keine Abkürzung erforderlich war, wurden mit der vollen Bezeichnung beschriftet. Die Ergebnisse des Permutationstests und des Interval Mappings für die Kartierungsmutter Karneol sind in der nachfolgenden Tabelle 15 zusammengefasst.

Tabelle 15: Positionen der berechneten QTLs für die Kartierungsmutter Karneol, die anhand des Interval Mappings nachgewiesen wurden

Merkmale/Umwelt	LOD max. gemessen ¹	Detektionsschwelle (LOD) ²	KG ³	HG ⁴
Pflanzenhöhe 2	3,29	2,0	K51	24
	4,02	2,3	K53	6
Pflanzenhöhe 3	3,44	2,8	K11	10
	4,57	2,7	K44	2
Blütenstiellänge 1	3,89	3,1	K5	4
Blütenstiellänge 3	3,31	2,3	K7	NA ⁵
	4,18	3,1	K11	10
	3,26	2,4	K53	6
	3,18	2,5	K55	27
Anzahl Blütenblätter 1	6,2	4,3	K31	17
	4,89	4,1	K34	18
	10,44	4,6	K48	22
	3,78	2,7	K49	24
	5,74	3,6	K50	NA
Anzahl Blütenblätter 2	3,48	1,9	K73	NA
Anzahl Blütenblätter 3	3,75	3,4	K1	NA
	6,07	3,3	K2	NA
	5,36	3,6	K3	2
	3,44	2,5	K49	24
Länge Zungenblüten 1	3,38	2,8	K19	NA
	3,25	2,3	K34	18
	3,65	2,1	K37	1
Länge Zungenblüten 2	3,53	3,0	K20	12
Länge Zungenblüten 3	3,82	2,7	K6	8
Breite Zungenblüten 1	3,49	2,5	K19	NA
	4,48	2,3	K34	18
Breite Zungenblüten 2	3,09	2,6	K45	1
	3,37	1,7	K58	NA
Blattlänge 2	3,74	2,5	K5	4
	3,21	2,5	K53	6
Blattlänge 3	4,66	3,4	K44	2
Blattbreite 1	3,48	2,9	K44	2
	3,62	2,4	K55	27
Blattbreite 2	3,61	2,7	K53	6
Blattbreite 3	4,83	2,6	K44	2

1 = höchster gemessener LOD-Wert für die jeweilige Assoziation; 2 = Detektionsschwelle ermittelt durch den Permutationstest; 3 = Kopplungsgruppe; 4 = Homöologengruppe; 5 = Kopplungsgruppe ist keiner Homöologengruppe zugeordnet.

Für Karneol konnten anhand des Interval Mappings insgesamt 35 QTLs für sieben unterschiedliche Merkmale detektiert werden. Jeweils zwei QTLs für die Pflanzen-

höhe in den Umwelten 2 bzw. 3 wurden bei LOD-Werten zwischen 3,29 und 4,57 nachgewiesen.

Für die Blütenstiellänge wurden insgesamt fünf QTLs in den Umwelten 1 bzw. 3 bei LOD-Werten zwischen 3,18 und 4,18 kartiert. Alle diese QTLs wurden auf unterschiedlichen KGs lokalisiert.

Für die Anzahl der Blütenblätter wurden zehn QTLs nachgewiesen. Davon wurden fünf für die Umwelt 1, einer für die Umwelt 2 und vier QTLs für die Umwelt 3 detektiert. Lediglich zwei dieser QTLs konnten übereinstimmend für die Umwelten 1 und 3 auf der KG 49 bei den LOD-Werten 3,44 und 3,78 nachgewiesen werden. Diese QTLs waren jedoch 26,5 cM voneinander entfernt. Die übrigen QTLs für die Anzahl der Blütenblätter wurden jeweils auf unterschiedlichen KGs kartiert. Die LOD-Werte für die QTLs lagen zwischen 3,44 und 10,44.

Für die Länge der Zungenblüten wurden insgesamt fünf QTLs auf jeweils unterschiedlichen KGs bei LOD-Werten zwischen 3,25 und 3,82 nachgewiesen. Davon wurden drei QTLs für die Umwelt 1, einer für die Umwelt 2 und ein weiterer für die Umwelt 3 kartiert.

Für die Breite der Zungenblüten wurden vier QTLs bei LOD-Werten zwischen 3,09 und 4,48 auf jeweils unterschiedlichen KGs kartiert. Davon wurden jeweils zwei für die Umwelt 1 und die übrigen beiden QTLs für die Umwelt 2 nachgewiesen.

Für die Blattlänge wurden drei QTLs bei LOD-Werten zwischen 3,21 und 4,66 auf verschiedenen KGs kartiert. Davon wurden zwei für die Umwelt 2 und einer für die Umwelt 3 detektiert.

Für die Blattbreite wurden vier QTLs nachgewiesen. Davon wurden zwei QTLs, einer für die Umwelt 1, der andere für die Umwelt 3, in der gleichen Region auf der KG K44 kartiert. Diese beiden QTLs wiesen LOD-Werte von 3,48 und 4,83 auf. Die übrigen beiden QTLs wurden für die Umwelten 1 und 2 bei LOD-Werten von 3,61 und 3,62 auf unterschiedlichen KGs lokalisiert. Die Verteilung der QTLs über die verschiedenen KGs wurde bereits in der oben aufgeführten Tabelle 15 zusammengefasst.

Auf folgenden KGs wurden für die Kartierungsmutter Karneol mehrere QTLs anhand des Interval Mappings kartiert:

K5:

- Blütenstiellänge für Umwelt 1 (LOD-Wert = 3,89)
- Blattlänge für Umwelt 2 (LOD-Wert = 3,74)

Die QTLs wurden in unterschiedlichen Regionen der KG K5 lokalisiert.

K11:

- Pflanzenhöhe für Umwelt 3 (LOD-Wert = 3,44)
- Blütenstiellänge für Umwelt 3 (LOD-Wert = 4,18)

Die QTLs wurden in verschiedenen Abschnitten der KG K11 kartiert.

K19:

- Länge der Zungenblüten für Umwelt 1 (LOD-Wert = 3,38)
- Breite der Zungenblüten für Umwelt 1 (LOD-Wert = 3,49)

Die beiden QTLs überschneiden sich auf der KG K19.

K34:

- Anzahl Blütenblätter für Umwelt 1 (LOD-Wert = 4,89)
- Länge der Zungenblüten für Umwelt 1 (LOD-Wert = 3,25)
- Breite der Zungenblüten für Umwelt 1 (LOD-Wert = 4,48)

Die drei QTLs befinden sich in der gleichen Region der KG K34.

K44:

- Pflanzenhöhe für Umwelt 3 (LOD-Wert = 4,57)
- Blattlänge für Umwelt 3 (LOD-Wert = 4,66)
- Blattbreite für Umwelt 1 (LOD-Wert = 3,48)
- Blattbreite für Umwelt 3 (LOD-Wert = 4,83)

Die vier QTLs wurden im gleichen Bereich der KG K44 lokalisiert.

K49:

- Anzahl Blütenblätter für Umwelt 1 (LOD-Wert = 3,78)
- Anzahl Blütenblätter für Umwelt 3 (LOD-Wert = 3,44)

Die QTLs wurden in unterschiedlichen Regionen der KG K49 kartiert.

K53:

- Pflanzenhöhe für Umwelt 2 (LOD-Wert = 4,02)
- Blütenstiellänge für Umwelt 3 (LOD-Wert = 3,26)
- Blattlänge für Umwelt 2 (LOD-Wert = 3,21)
- Blattbreite für Umwelt 2 (LOD-Wert = 3,61)

Die vier QTLs überlappen sich auf der KG K53.

K55:

- Blütenstiellänge für Umwelt 3 (LOD-Wert = 3,18)
- Blattbreite für Umwelt 1 (LOD-Wert = 3,62)

Die beiden QTLs, die auf der KG K55 detektiert wurden, überschneiden sich.

Für die Kartierungsmutter Karneol wurden anhand des Interval Mappings folgende Markerassoziationen an potentiell voneinander abhängigen Merkmalen in jeweils den gleichen Bereichen einer KG nachgewiesen:

K19:

- Länge der Zungenblüten und Breite der Zungenblüten für Umwelt 1

K34:

- Länge der Zungenblüten und Breite der Zungenblüten für die Umwelt 1

K37:

- Länge der Zungenblüten für Umwelt 1 und Breite der Zungenblüten für Umwelt 2

K44:

- Blattlänge für Umwelt 3 und Blattbreite für Umwelt 1

K53:

- Pflanzenhöhe für Umwelt 2 und Blütenstiellänge für Umwelt 3
- Blattlänge und Blattbreite für Umwelt 2

Für den Kartierungsvater Nordlicht wurden anhand des Interval Mappings insgesamt 16 QTLs für neun Merkmale detektiert. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle 16 zusammengefasst.

Tabelle 16: Positionen der berechneten QTLs für den Kartierungsvater Nordlicht, die anhand des Interval Mappings nachgewiesen wurden

Merkmals/Umwelt	LOD max. gemessen ¹	Detektionsschwelle (LOD) ²	KG ³	HG ⁴
Pflanzenhöhe 3	3,60	3,2	N1	3
Blütenstandsdurchmesser 1	3,33	2,7	N55	24
Blütenstandsdurchmesser 3	3,11	2,2	N43	NA ⁵
Blütenstiellänge 1	3,69	3,1	N22	2
Blütenstiellänge 3	4,36	2,5	N39	NA
Anzahl Blütenblätter 2	6,93	3,3	N37	2
Anzahl Blütenblätter 3	8,86	2,8	N35	4
Breite der Zungenblüten 1	3,59	3,3	N1	3
	3,75	2,3	N37	2
Breite der Zungenblüten 2	3,64	2,3	N14	7
Breite der Zungenblüten 3	4,28	3,4	N1	3
	3,77	2,7	N22	2
	3,59	2,4	N33	NA
	3,41	2,4	N39	NA
Blattlänge 1	3,82	1,5	N48	12
Blattbreite 1	3,49	2,6	N21	4

1 = höchster gemessener LOD-Wert für die jeweilige Assoziation; 2 = Detektionsschwelle ermittelt durch den Permutationstest; 3 = Kopplungsgruppe; 4 = Homöologengruppe; 5 = Kopplungsgruppe ist keiner Homöologengruppe zugeordnet

Für Nordlicht konnte anhand des Interval Mappings für die Pflanzenhöhe lediglich ein QTL in der Umwelt 3 bei einem LOD-Wert von 3,60 auf der KG N1 nachgewiesen werden.

Für den Blütenstandsdurchmesser wurden zwei QTLs in den Umwelten 1 bzw. 3 bei LOD-Werten von 3,11 und 3,33 auf den KGs N43 und N55 kartiert.

Für die Blütenstiellänge wurde jeweils ein QTL in der Umwelt 1 und in der Umwelt 3 bei den LOD-Werten 3,69 und 4,36 auf den KGs N22 und N39 detektiert.

Für die Anzahl der Blütenblätter wurde je ein QTL in der Umwelt 2 und in der Umwelt 3 bei LOD-Werten von 6,93 bzw. 8,86 nachgewiesen. Die beiden QTLs wurden auf den KGs N35 bzw. N37 kartiert.

Für die Breite der Zungenblüten wurden sieben QTLs bei LOD-Werten zwischen 3,41 und 4,28 nachgewiesen. Von diesen sieben QTLs wurden zwei (jeweils einer in der Umwelt 1 und Umwelt 3) in unterschiedlichen Regionen auf der KG N1 detektiert.

Außerdem wurden zwei weitere QTLs, jeweils einer auf der KG N37 und einer auf der KG N22, kartiert, die beide der Homöologengruppe 2 angehören. Die übrigen drei QTLs für die Breite der Zungenblüten wurden auf den KGs N14, N33 und N39 lokalisiert.

Für die Blattlänge wurden zwei QTLs für die Umwelt 1 bei LOD-Werten von 3,82 und 3,49 auf den KGs N21 und N48 kartiert.

Auf folgenden KGs wurden für den Kartierungsvater Nordlicht mehrere QTLs anhand des Interval Mappings kartiert:

N1:

- Pflanzenhöhe für Umwelt 3 (LOD-Wert = 3,60)
- Breite der Zungenblüten für Umwelt 1 (LOD-Wert = 3,59)
- Breite der Zungenblüten für Umwelt 3 (LOD-Wert = 4,28)

Alle drei QTLs wurden in unterschiedlichen Regionen der KG N1 lokalisiert.

N22:

- Blütenstiellänge für Umwelt 1 (LOD-Wert = 3,69)
- Breite der Zungenblüten für Umwelt 3 (LOD-Wert = 3,77)

Die beiden QTLs wurden jeweils in verschiedenen Bereichen der KG N22 kartiert.

N37:

- Anzahl Blütenblätter für Umwelt 2 (LOD-Wert = 6,93)
- Breite der Zungenblüten für Umwelt 1 (LOD-Wert = 3,75)

Die QTLs wurden in unterschiedlichen Abschnitten der KG N37 detektiert.

N39:

- Blütenstiellänge für Umwelt 3 (LOD-Wert = 4,36)
- Breite der Zungenblüten für Umwelt 3 (LOD-Wert = 3,41)

Die QTLs wurden nicht in der gleichen Region der KG N39 lokalisiert.

Anhand des Interval Mappings wurden für die beiden Kartierungseltern signifikante Korrelationen zwischen Genomregionen der berechneten Kopplungskarten nachgewiesen. Jedoch war die Reproduzierbarkeit vieler der detektierten QTLs über die unterschiedlichen Umwelten gering.

3.4.3 Marker- Merkmalsassoziationen, die übereinstimmend durch das Interval Mapping und den *Kruskal-Wallis*-Test nachgewiesen wurden

Nachdem das Interval Mapping und der *Kruskal-Wallis*-Test durchgeführt worden waren, wurde ebenfalls überprüft, ob anhand dieser beiden Methoden für bestimmte KGs übereinstimmende Assoziationen zwischen den Markern für die Population K5 und den erhobenen Merkmalen detektiert wurden.

Für die Kartierungsmutter Karneol wurden übereinstimmend durch das Interval Mapping und den *Kruskal-Wallis*-Test Assoziationen von Markern bzw. Genomregionen an die Anzahl der Blütenblätter auf der KG K1 nachgewiesen. Für den Marker H700ACGT_MATGA131 wurde eine signifikante Assoziation bei einem P-Wert von 0,0001 detektiert. Der LOD-Wert für den entsprechenden QTL, der anhand des Interval Mappings identifiziert wurde, beträgt 3,75. Der Marker und der QTL, die anhand der beiden Methoden detektiert wurden, lagen jedoch etwa 29 cM voneinander entfernt. Dabei ist zu berücksichtigen, dass der Marker H700ACGT_MATGA131 am oberen Ende der KG K1 lediglich sehr schwach mit einer Distanz von 23,4 cM an die übrigen Marker dieser KG gekoppelt ist.

Für potentiell voneinander abhängige Merkmale konnten für die Kartierungsmutter Karneol durch die beiden hier angewendeten Methoden keine übereinstimmenden Korrelationen an die Marker gezeigt werden.

Für den Kartierungsvater Nordlicht konnten übereinstimmend durch das Interval Mapping und den *Kruskal-Wallis*-Test keine Assoziationen von Markern bzw. Genomregionen einer KG an ein bestimmtes Merkmal nachgewiesen werden. Lediglich für zwei potentiell voneinander abhängige Merkmale konnten durch beide Methoden Markerassoziationen übereinstimmend auf einer KG detektiert werden: Für die Länge der Zungenblüten wurde anhand des *Kruskal-Wallis*-Tests für den Marker H700_MATGG390 eine Assoziation auf der KG N37 nachgewiesen, auf der ebenfalls anhand des Interval Mappings ein QTL für die Breite der Zungenblüten in der Umwelt 1 gemessen wurde. Die entsprechenden Regionen bzw. Marker sind jedoch etwa 8 cM voneinander entfernt.

Für den Kartierungsvater Nordlicht konnten keine weiteren Markerassoziationen an potentiell voneinander abhängige Merkmale wie z.B. Blattbreite und Blattlänge durch die beiden angewendeten Methoden nachgewiesen werden.

3.5 Ergebnisse der interspezifischen Kreuzungsversuche

Um neue Merkmale für die Züchtung von Dahliensorten in das Zuchtmaterial der Gartendahlie zu überführen, wurden Kreuzungen zwischen den Wildarten *D. dissecta* und *D. macdougallii* mit der Gartendahlie durchgeführt. Jedoch konnte durch die Kreuzungen zwischen *D. dissecta* und *D. variabilis* kein keimungsfähiges Saatgut erzeugt werden. Die Wildart *D. dissecta* bildete im Gewächshaus in drei Jahren an zwei Pflanzen lediglich sieben Blüten, die keinen Samenansatz bei einer Bestäubung mit dem Pollen von *D. variabilis* zeigten. Ausgepflanzt auf einem Gartendahlienfeld im Freiland blühte diese Wildart sehr spät, weshalb eine Reifung der Samenkapseln nicht möglich war.

Lediglich für die Kreuzungen zwischen der Gartendahliensorte Roxy als Mutter mit der Wildart *D. macdougallii* als Vater gelang es im Gewächshaus keimungsfähiges Saatgut zu erzeugen, das zwölf Nachkommen (DH2007-413 bis DH2007-424) hervorbrachte. Um zu überprüfen, ob es sich dabei um Hybriden oder Selbstungen der Mutter Roxy handelt, wurden auf die Eltern sowie die zwölf Nachkommen die drei Mikrosatellitenmarker DV01, DV02 und DV03 angewendet. Ein Beispiel für einen solchen Nachweis ist in der folgenden Abbildung 7 dargestellt.

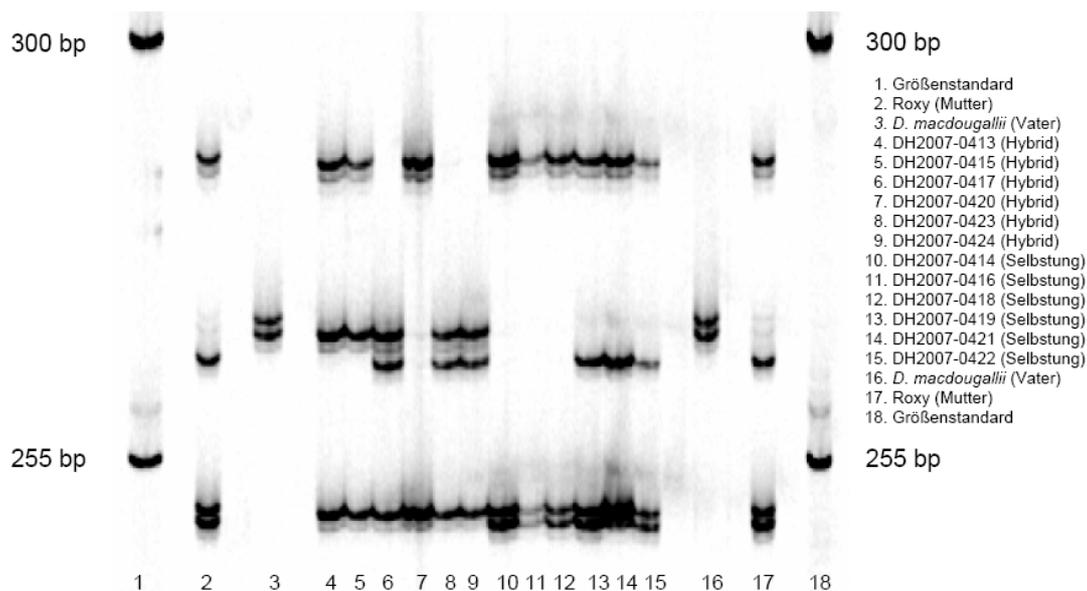


Abbildung 7: Hybridnachweis für die Nachkommen der interspezifischen Kreuzungsversuche anhand des Mikrosatellitenmarkers DV03. Dieser Mikrosatellitenmarker wurde auf die Kreuzungseltern Roxy (Mutter) und *D. macdougallii* (Vater) sowie deren Nachkommen angewendet. Für die Wildart *D. macdougallii* wurde durch den Marker DV03 ein spezifisches Allel amplifiziert, welches für die Nachkommen in den Spuren 4 bis 6 sowie 8 und 9 ebenfalls nachgewiesen wurde.

Die Ergebnisse der Nachkommenschaftsanalyse sind in der nachfolgenden Tabelle 17 zusammengefasst. Die Kodierung für die väterlichen Banden ist in der Farbe Rot hervorgehoben.

Tabelle 17: Zusammenfassung des Hybridnachweises für die Nachkommen der interspezifischen Kreuzungsversuche zwischen Roxy und *D. macdougallii* anhand der drei Mikrosatellitenmarker DV01, DV02 und DV03

Marker- allele	Mutter	Vater	Nachkommen DH2007-											
	Roxy	<i>D. macdougallii</i>	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424
DV01 A	1 ¹	0 ²	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1
DV01 B	0	1 ³	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0
DV02 A	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1
DV02 B	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
DV02 C	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
DV02 D	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0
DV03 A	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0
DV03 B	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
DV03 C	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1
DV03 D	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1
DV03 E	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
DV03 F	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0

1 = mütterliche Bande vorhanden
 2 = Bande nicht vorhanden
 3 = väterliche Bande vorhanden

Für die Nachkommen DH2007-0413, DH2007-0415, DH2007-0417 und DH2007-0423 wurde durch alle drei angewendeten Mikrosatellitenmarker DV01, DV02 und DV03 jeweils eine väterliche Bande detektiert. Für DH2007-0424 konnten zwei paternale Allele anhand der beiden Marker DV02 und DV03 nachgewiesen werden. DH2007-0420 wies lediglich ein väterliches Mikrosatelliten-Allel für den Marker DV01 auf. Daher ist davon auszugehen, dass die sechs Nachkommen DH2007-0413, DH2007-0415, DH2007-0417, DH2007-0420, DH2007-0423 und DH2007-0424 tatsächlich Hybride aus den beiden elterlichen Dahlienarten darstellen. Für die übrigen Nachkommen DH2007-0414, DH2007-0416, DH2007-0418, DH2007-0419, DH2007-0421 und DH2007-0422 wurde durch keinen der angewendeten Marker eine väterliche Bande amplifiziert. Daher ist davon auszugehen, dass es sich bei diesen Nachkommen wahrscheinlich um Selbstungen der Mutter Roxy handelt. Diese Nachkommen wurden deshalb aus allen nachfolgenden Analysen ausgeschlossen.

D. variabilis bildet nach der Induktion der Blüte terminale Infloreszenzen, weshalb an den Trieben daraufhin kein vegetatives Wachstum erfolgt. Die Wildart *D. macdougallii* weist hingegen ein nicht determiniertes Wachstum der terminalen Triebe auf. Deshalb erfolgt an den Trieben nach der Induktion der Blüte zunächst weiterhin ein vegetativer Zuwachs. Zudem zeigen die Blütenstängel eine stärkere Verzweigung als die Gartendahlien, wie auf der folgenden Abbildung 8 zu erkennen ist.



Abbildung 8: Blütenstängel der Wildart *D. macdougallii*; Foto: Hilke Wegner

Für einen Vergleich ist in der folgenden Abbildung 9 der Blütenstängel der Gartendahliensorte Roxy dargestellt.



Abbildung 9: Blütenstängel der Gartendahliensorte Roxy

Wie zu erkennen ist, bildet die Gartendahliensorte Roxy lediglich bis zu drei Blüten an einem blühenden Endtrieb. Die erzeugten Arthybriden DH2007-415 und DH2007-417 weisen ebenfalls wie die Wildart *D. macdougalii* ein nicht determiniertes Wachstum der terminalen Triebe und eine höhere Verzweigung des Blütenstängels gegenüber Roxy auf. Dadurch bilden sie eine höhere Anzahl Blüten an einem Endtrieb, wie in der folgenden Abbildung 10 zu sehen ist.



Abbildung 10: Blütenstängel des Arthybriden DH2007-417

Die erzeugten Hybriden brachten bei einer offenen Abblüte ausgepflanzt auf einem Feld zusammen mit Gartendahlien und einigen Wildarten 17 Samen hervor. Aufgrund der späten Blüteninduktion der Hybriden und einer frühen Frostperiode musste dieses Saatgut zum Teil unausgereift geerntet werden. Das geerntete Saatgut wurde ausgepflanzt und brachte vier Keimlinge (DH2007-417-FA1 bis DH2007-417-FA4) hervor.

Es ist davon auszugehen, dass die Gartendahlien-Sorte Roxy $2n = 64$ Chromosomen, also den doppelten Chromosomensatz der Wildart *D. macdougallii* mit $2n = 32$ Chromosomen, aufweist. Kreuzungen zwischen diesen beiden Ploidiestufen können sowohl oktaploide als auch hexaploide Nachkommen hervorbringen (Lawrence 1931, Hansen und Hjerting 2000). Daher wurden die Genomgrößen von Roxy, *D. macdougallii*, der Arthybriden und deren Nachkommen anhand von Durchflusszytometrie bestimmt.

3.6 Durchflusszytometrie zur Bestimmung der Genomgröße der Nachkommen der interspezifischen Kreuzungsversuche

Die Messungen am Durchflusszytometer wurden zunächst jeweils für die Kreuzungsmutter Roxy ($2n = 64$ Chromosomen) und den Vater *D. macdougallii* ($2n = 32$ Chromosomen) einzeln und anschließend gemeinsam durchgeführt. Auf diese Weise konnten die erhaltenen Peaks den unterschiedlichen Ploidiestufen zugeordnet werden. Außerdem wurde dabei ermittelt, welche Verstärkungsintensität erforderlich war, um eine ausreichende Auflösung zwischen den beiden Peaks für die Eltern, zu erreichen. Dies ermöglichte es die Peaks der Eltern zu denen ihrer Nachkommen in Relation zu setzen und Rückschlüsse auf deren Ploidiestufen zu ziehen. Ein solcher Vergleich der Hybride DH2007-417 mit den Eltern ist in der folgenden Abbildung 11 dargestellt.

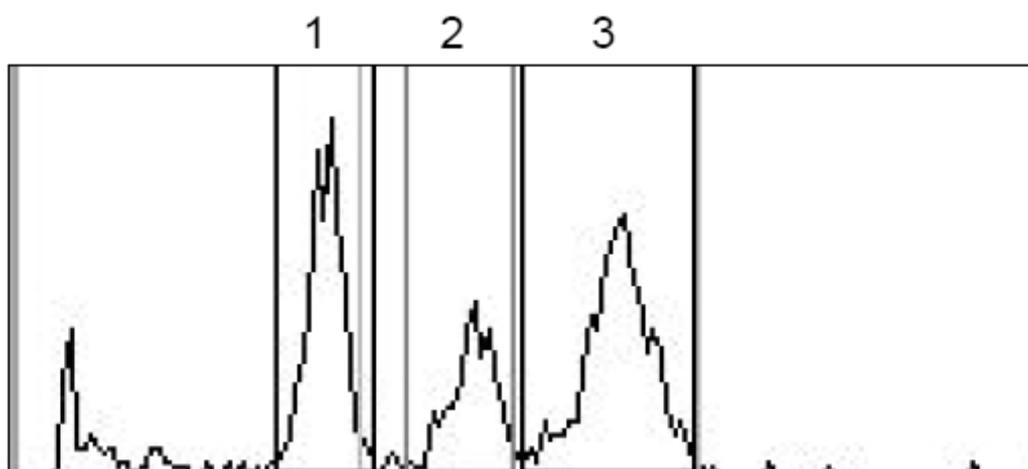


Abbildung 6: Peaks der Durchflusszytometrie-Messung für die Wildart *D. macdougallii* (Peak 1), die Arthybride DH2007-417 (Peak 2) und der Gartendahliensorte Roxy (Peak 3).

Die Peaks der beiden Hybriden DH2007-415 und DH2007-417 waren mittig zwischen denen der Eltern angeordnet. Bei den Messungen der Nachkommen der Arthybride DH2007-417 (DH2007-417-FA1 bis DH2007-417-FA4) gemeinsam mit Roxy und *D. macdougallii* waren hingegen lediglich zwei Peaks zu beobachten, die sich an den gleichen Positionen wie die elterlichen Peaks befanden.

Im Anschluss an diese vergleichenden Analysen wurden die Genomgrößen beider Eltern, der Arthybriden sowie der Nachkommen der Arthybride DH2007-417 jeweils einzeln mit einer Tomate (*Lycopersicon esculentum*; Sorte Stupicke Polni Rane; $2C =$

1.96 pg; Doležl et al. 1992) als Referenz, gemessen. Auf diese Weise sollten die 2C-Werte für die untersuchten Dahliengenotypen ermittelt werden. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in der nachfolgenden Tabelle 18 zusammengefasst. Die Abbildungen aller Messungen zur Bestimmung der Genomgrößen sind auf der CD im Anhang beigefügt.

Tabelle 18: C-Werte für die erzeugten Arthybriden sowie deren Eltern und Nachkommen

Genotyp	Ploidiestufe	2C-Wert in pg	1Cx-Wert in pg
<i>D. macdougallii</i>	4x	3,85	0,96
Roxy	8x	7,79	0,97
DH2007-415	6x	5,78	0,96
DH2007-417	6x	5,87	0,98
DH2007-417-FA1	8x	7,60	0,95
DH2007-417-FA2	8x	7,54	0,94
DH2007-417-FA3	8x	7,33	0,92
DH2007-417-FA4	8x	7,20	0,90

Die Messungen der Genomgrößen ergaben, dass die Gartendahliensorte Roxy mit $2n = 64$ Chromosomen, wie es zu erwarten war, etwa den doppelten 2C-Wert (Größe des gesamten Chromosomensatzes unabhängig von der Ploidiestufe; Greilhuber et al. 2005) der Wildart *D. macdougallii* mit $2n = 32$ Chromosomen aufwies. Die Messwerte für die Arthybriden entsprachen etwa dem Mittelwert der beiden Eltern. Die Werte für die Nachkommen der Arthybride DH2007-417 hingegen waren den Messwerten der Gartendahliensorte Roxy sehr ähnlich und lediglich etwas geringer als diese.

Anschließend wurden, die 1Cx-Werte (Größe des haploiden Chromosomensatzes; Greilhuber et al. 2005) für Roxy, *D. macdougallii*, die Arthybriden und deren Nachkommen berechnet. Dabei wurde für Roxy eine Oktoploidie und für *D. macdougallii* eine Tetraploidie angenommen. Da die Peaks für die Hybriden zwischen denen ihrer Eltern lagen, wurde für sie eine Hexaploidie angenommen. Die Nachkommen der Arthybride DH2007-417 (DH2007-417-FA1 bis DH2007-417-FA4) wiesen Peaks auf, die annähernd denen der Mutter Roxy entsprachen. Daher wurde für sie bei der Berechnung der 1Cx-Werte von einer Oktoploidie ausgegangen.

Die 1Cx-Werte für Roxy, *D. macdougallii* und die Arthybriden lagen zwischen 0,96 pg und 0,98 pg recht nah beieinander. Der durchschnittliche 1Cx-Wert für diese

Genotypen beträgt 0,97 pg. Die Werte für den haploiden Chromosomensatz der Nachkommen der Arthybriden wiesen mit Werten zwischen 0,90 pg und 0,95 pg eine etwas größere Streuung als die ihrer Vorfahren auf. Der durchschnittliche 1Cx-Wert beträgt für diese Nachkommen 0,93 pg. Somit waren die 1Cx-Werte der Nachkommen der Arthybriden gegenüber ihren Vorfahren etwas geringer.

4. Diskussion

4.1 Untersuchungen der Genomstruktur von *Dahlia variabilis*

Die bisherigen Untersuchungen der Genomstruktur der Gartendahlie führten zu widersprüchlichen Hypothesen (siehe 1.4) und deuten darauf, dass *D. variabilis* ein komplexer polyploider Organismus ist. Um den Ploidietypus und die Ploidiestufe von *D. variabilis* ($2n = 64$ Chromosomen) zu bestimmen, wurden in der vorliegenden Arbeit molekulare Marker genutzt. Die Kombination von AFLP[®]- und Mikrosatellitenmarkern erschien für die Untersuchung der Genomstruktur eines polyploiden Organismus sinnvoll, da sich diese Markersysteme bezüglich der Fragestellung gegenseitig ergänzen. Die Spaltungsdaten beider Markersysteme stellen die Grundlage für unterschiedliche Methoden zur Bestimmung des Ploidietypus sowie der Ploidiestufe dar. Die hohe Anzahl der AFLP[®]-Marker ist für eine ausreichende Auflösung durch die statistischen Methoden zur Unterscheidung der beiden Ploidietypen Allopolyploid und Autopolyploid notwendig. Des Weiteren ermöglicht diese hohe Anzahl an Markern die Berechnung von genetischen Kopplungsgruppen und stellt somit das Grundgerüst einer Kopplungskarte. Anhand von Mikrosatellitenmarkern wird hingegen ein Abschnitt der homologen bzw. homöologen Chromosomen detektiert, wodurch Rückschlüsse auf deren Anzahl und ihre Beziehung zueinander gezogen werden können. Außerdem ermöglichen es diese Marker, homologe bzw. homöologe Kopplungsgruppen bei der Kartierung zu identifizieren und in Homöologengruppen zusammenzufassen.

Daher wurden in den Populationen K1 (130 Individuen) und K5 (173 Individuen) zunächst jeweils die 14 zuvor entwickelten Mikrosatellitenmarker untersucht. Da diese beiden Populationen unterschiedliche genetische Hintergründe aufweisen, sollten auf diese Weise populationsspezifische Einflüsse wie Inzuchtdepression oder eine starke Selektion auf bestimmte Merkmale innerhalb eines Genpools auf die Beurteilung des Ploidietypus ausgeschlossen werden.

Außerdem wurden die Mikrosatellitenmarker in den potentiellen Ursprungsarten der Gartendahlie *D. coccinea* und *D. sorensenii* (Sørensen 1970, Hansen und Hjerting 1996), und in anderen Dahlienwildarten getestet. Auf diese Weise sollte sichergestellt werden, dass deren Genome bei den Untersuchungen der Gartendahlie tatsächlich

anhand der Mikrosatellitenmarker nachgewiesen werden können. Die erfolgreiche Amplifikation dieser Marker in diesen Arten (siehe 3.2.1) schließt daher aus, dass bestimmte Allele durch die Mikrosatellitenmarker nicht nachgewiesen werden können. In die Analysen wurden ebenfalls Wildarten mit $2n = 32$ Chromosomen einbezogen, um Informationen über diese Ploidiestufe zu erhalten und ggf. Rückschlüsse auf die Arten mit $2n = 64$ Chromosomen ziehen zu können.

4.1.1 Bestimmung der Ploidiestufe von *Dahlia variabilis* durch Mikrosatellitenmarker

Die bisherigen Untersuchungen an Dahlien führten zu keinem eindeutigen Rückschluss auf die Ploidiestufe der Gartendahlie. Sørensen (1969) vermutete, dass *D. variabilis* sowie die Wildarten mit $2n = 64$ Chromosomen tetraploid seien. Lawrence (1929) und Gatt et al. (1998) hingegen nahmen an, dass die Gartendahlie oktaploid sei (siehe 1.4).

Tatsächlich erscheint es unwahrscheinlich, dass die Arten mit $2n = 64$ Chromosomen tetraploid sind, da die Arten mit $2n = 32$ Chromosomen vermutlich bereits polyploid sind (Gatt et al. 1998). Die Annahme dieser Ploidiestufe würde zudem für diese Arten einen haploiden Chromosomensatz von $x = 16$ voraussetzen, was einen äußerst großen Basischromosomensatz darstellen würde (Lawrence 1929). Eine Hexaploidie ist für die Arten mit $2n = 64$ Chromosomen auszuschließen, da sich ihr Chromosomensatz nicht durch die Zahl Sechs in eine natürliche Zahl dividieren lässt. Daher scheinen die Wildarten mit $2n = 64$ Chromosomen sowie *D. variabilis* oktaploid zu sein oder eine höhere Ploidiestufe aufzuweisen.

Anhand von Mikrosatellitenmarkern kann für jedes homologe bzw. homöologe Chromosom, auf dem sich die entsprechende Sequenz der Primerbindungsstelle befindet, ein Allel amplifiziert werden. Daher ermöglichen es diese Marker, Rückschlüsse auf die Anzahl der homologen bzw. homöologen Chromosomen zu ziehen, und liefern somit einen Hinweis auf die Ploidiestufe des betroffenen Organismus. Deshalb wurden für die Gartendahliepopulationen K1 und K5, sowie für Wildarten mit $2n = 32$ Chromosomen und $2n = 64$ Chromosomen für jeden der angewendeten Mikrosatellitenmarker die Anzahlen der amplifizierten Banden pro Genotyp ermittelt.

Dabei wurden für die Wildarten mit $2n = 32$ Chromosomen maximal drei Allele pro Genotyp (durchschnittlich 1,9 Allele), für die Wildarten mit $2n = 64$ Chromosomen maximal vier Allele (durchschnittlich 3,1 Allele) und für die Populationen K1 und K5 jeweils maximal acht Allele pro Genotyp (durchschnittlich 4,6 Allele pro Genotyp, siehe 3.2.1) gezählt.

Daher ist für die Gartendahlie und den Wildarten mit $2n = 64$ Chromosomen wahrscheinlich von einer Oktoploidie auszugehen. Weitere Hinweise darauf, dass *D. variabilis* oktoploid ist, liefern das Verhältnis von Attraktionskopplungen zu Repulsionskopplungen (siehe 4.1.5), sowie die Ergebnisse der Kartierung (siehe 4.4). Die Annahme dieser Ploidiestufe steht im Einklang mit den Untersuchungen von Gatt et al. (1998) und entspricht der Theorie von Lawrence (1929). Demnach ist für die Arten mit $2n = 32$ Chromosomen mit maximal drei Allelen pro Genotyp von einer Tetraploidie auszugehen. Deshalb werden in der folgenden Diskussion für die Arten mit diesen Chromosomenanzahlen die ermittelten Ploidiestufen angenommen. Diese Ergebnisse lassen für die Dahlien auf einen Basischromosomensatz von $x = 8$ schließen, wie Lawrence (1970) vermutete.

Setzt man diese Ploidiestufen voraus, deutet die niedrige Anzahl von maximal drei amplifizierten Allelen pro Genotyp für die Dahlienwildarten mit $2n = 32$ Chromosomen und maximal vier Allelen pro Genotyp für die Wildarten mit $2n = 64$ Chromosomen auf einen relativ geringen Grad an Heterozygotie hin. Da für die Gartendahliepopulationen K1 und K5 bis zu acht Allele pro Genotyp gezählt wurden, obwohl drei der vier Populationseltern aus demselben Genpool stammen, scheinen diese einen höheren Grad an Heterozygotie als die Wildarten aufzuweisen.

4.1.2 Nachweis polysomer Vererbung für *Dahlia variabilis* anhand der Spaltungsmuster von Mikrosatellitenmarkern

Lawrence (1929, 1931a) und Gatt et al. (1998) beobachteten für die Gartendahlie hohe Frequenzen an Bivalenten während der Meiose, wie sie charakteristisch für allopolyploide Organismen sind. Jedoch wiesen Lawrence und Scott Moncrieff (1935) für die Gartendahlie eine polysome Vererbung der Blütenfarbstoffe nach, die darauf deutet, dass die Gartendahlie autopolyploid ist. Daher konnte bis zu Beginn dieses Projektes nicht geklärt werden, welchen Ploidietypus die Gartendahlie aufweist. Um diesen zu bestimmen wurden zunächst die Spaltungsmuster der Mikrosatelliten-

marker für die Populationen K1 und K5 untersucht. Bei einer polysomen Vererbung findet eine freie Rekombination zwischen den homologen Chromosomen statt. Daraus resultiert eine freie Kombination aller unterschiedlichen Allele eines Mikrosatellitenmarkers in einer Nachkommenschaft. Disome Vererbung hingegen beruht auf der präferentiellen Paarung zwischen zwei homologen Chromosomen der diploiden Subgenome eines allopolyploiden Organismus. Da diese nach der Meiose jeweils in unterschiedliche Gameten aufgeteilt werden, können die Allele eines Mikrosatellitenmarkers, die auf den unterschiedlichen beiden Homologen lokalisiert sind, nicht gemeinsam vererbt werden (siehe 1.3.2). Daher ist für Allopolyploide mit disomer Vererbung zu erwarten, dass die beiden Mikrosatelliten-Allele eines diploiden Subgenomes stets getrennt voneinander an eine Nachkommenschaft vererbt werden. Ein weiteres charakteristisches Spaltungsmuster für Allopolyploide ist die fixierte Heterozygotie (siehe 1.2). Deshalb wurden die Spaltungsmuster der Mikrosatellitenmarker für die beiden untersuchten Populationen darauf überprüft, ob zwischen den unterschiedlichen Allelen eine freie Kombination zu beobachten war, oder ob bestimmte Allele stets gemeinsam in fixierter Heterozygotie, in den untersuchten Nachkommenschaften vererbt wurden.

In den Populationen K1 und K5 wurde für keinen der Mikrosatellitenmarker Allelkombinationen gefunden, die nie zusammen oder immer gemeinsam in fixierter Heterozygotie vererbt wurden. Stattdessen war eine freie Kombination der parentalen Allele innerhalb der Nachkommenschaften zu beobachten. Dies deutet auf eine freie Rekombination der homologen bzw. homöologen Chromosomen für *D. variabilis*. Somit ist eine disome Vererbung, die typisch für Allopolyploide ist, für die Gartendahlie auszuschließen. Stattdessen ist für sie von einer polysomen Vererbung auszugehen, wie sie charakteristisch für einen autopolyploiden Organismus ist. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Untersuchungen von Lawrence und Scott Moncrieff (1935), die eine polysome Vererbung der Blütenfarbstoffe für *D. variabilis* beobachtet haben.

4.1.3 Kein eindeutiger Hinweis auf die Genomstruktur von *Dahlia variabilis* durch die Spaltungsanalyse für die Populationen K1 und K5

Multidosemarker (MD-Marker) werden im Gegensatz zu Singledosemarkern (SD-Marker) für die verschiedenen Ploidietypen bzw. Ploidiestufen in unterschiedlichen Frequenzen an eine Nachkommenschaft vererbt. Daher können die Spaltungsverhältnisse dieser Marker Hinweise auf die Genomstruktur des betroffenen Organismus liefern. Deshalb wurde anhand der Markerdaten für die Populationen K1 und K5 ein Chi-Quadrat-Anpassungstest (Pearson 1900) auf alle theoretisch möglichen Spaltungsverhältnisse der Ploidietypen Allopolyploid und Autopolyploid jeweils für die Ploidiestufen Tetraploid und Oktoploid durchgeführt. Auf diese Weise sollten charakteristisch spaltende MD-Marker identifiziert werden. Dabei wurden die Markerdaten ebenfalls auf das verschobene Spaltungsverhältnis 1:2 getestet, da dieses häufig für Polyploide nachgewiesen wurde (Lacape et al. 2003). Die theoretischen Spaltungsverhältnisse für die Ploidietypen bzw. -stufen auf welche die Markerdaten überprüft wurden, sind im Anhang in den Tabellen 20 und 21 aufgelistet.

Die Ergebnisse der Spaltungsanalysen für die Populationen K1 und K5 (siehe 3.2.3) deuten größtenteils auf eine disome Vererbung und somit auf eine Allopolyploidie für *D. variabilis*. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu der unter 4.1.2 diskutierten Schlussfolgerung der Analyse der Spaltungsmuster der Mikrosatellitenmarker, nach der für die beiden untersuchten Populationen von einer polysomen Vererbung auszugehen ist. Daher scheinen die entsprechenden Marker für die Populationen K1 und K5 fälschlicherweise disomen Spaltungsverhältnissen zugeordnet worden zu sein.

Ein Grund dafür könnte sein, dass die Unterschiede zwischen den Spaltungsverhältnissen für disome und polysome Vererbung zum Teil recht gering sind. Daher können sie statistisch sicher nur anhand größerer Stichprobenanzahlen nachgewiesen werden. Um beispielsweise anhand einer biparentalen Duplex-Konstellation ($AaAa \times AaAa$) eine eindeutige Unterscheidung zwischen den Spaltungsverhältnissen für Autotetraploide (35:1) und Allotetraploide (15:1; siehe Tabellen 20 und 21 im Anhang) zu erzielen, ist eine Populationsgröße von 376 Nachkommen erforderlich (Jones 1967). Deshalb sind für die Unterscheidung

zwischen den beiden Ploidietypen Autopolyploid und Allopolyploid sehr große Nachkommenschaften erforderlich. Die untersuchten Populationen (K1: 130 Nachkommen, K5: 173 Nachkommen) sind daher zu klein, um anhand einer Spaltungsanalyse eindeutige Rückschlüsse auf den Ploidietypus ziehen zu können. Ein weiterer Grund dafür, dass in der Spaltungsanalyse disome Spaltungsverhältnisse nachgewiesen wurden, könnte eine stark verschobene Spaltung in den beiden untersuchten Populationen darstellen. Einen Hinweis darauf liefern die Marker, für welche das verschobene Spaltungsverhältnis von 1:2 nachgewiesen wurde (sieben von 64 Markern für die Population K1; 86 von 1334 Markern für die Population K5). Die verschobene Spaltung war in beiden untersuchten Populationen zu beobachten. Daher ist anzunehmen, dass populationsspezifische Einflüsse wie Inzuchtdepression oder eine starke Selektion auf bestimmte Merkmale nicht die Ursache für die Abweichungen gegenüber den zu erwartenden Spaltungsverhältnissen darstellen.

Eine weitere Ursache für die verschobene Spaltung der Marker könnte ein männlicher Selbstinkompatibilitäts-Mechanismus oder an ein Lethalfaktor darstellen (Eijlander et al. 2000, Liebhard et al. 2003, Pugh et al. 2004). Jedoch wurden die SD-Marker mit einer schiefen Aufspaltung bei der Kartierung nicht gehäuft auf einzelnen Kopplungsgruppen lokalisiert, wie es bei einer Kopplung an einen solchen Locus zu erwarten wäre. Stattdessen wurden die entsprechenden Marker größtenteils verteilt über die verschiedenen Kopplungsgruppen lokalisiert. Zudem wiesen viele Marker, welche für die Mutter der Population K5 kartiert wurden, ebenfalls eine verschobene Spaltung auf und waren über die unterschiedlichen Kopplungsgruppen verteilt. Die Abdeckung der berechneten Kopplungskarten durch die kartierten Marker ist recht gering. Daher kann über die Verteilung der schief spaltenden Marker keine klare Aussage getroffen werden. Die Chi-Quadrat-Werte für die kartierten Marker sowie die Positionen der schief spaltenden Marker auf den elterlichen Karten sind auf der CD im Anhang aufgelistet.

Die verschobene Spaltung der Marker könnte außerdem auf Doppelreduktion (siehe 1.2) zurückzuführen sein. Diese wurde häufiger für Polyploide mit einer polysomen Vererbung beobachtet und kann einen Einfluss auf die Aufspaltung von Markern haben (Mather 1936, Luo et al. 2006). Da die Spaltungsmuster der Mikrosatellitenmarker auf eine freie Rekombination zwischen den homologen bzw. homöologen Chromosomen deuten (siehe 4.1.2), ist für *D. variabilis* ebenfalls von einer poly-

somen Vererbung auszugehen. Jedoch setzt Doppelreduktion nicht nur eine polysome Vererbung, sondern zusätzlich die Bildung von Multivalenten während der Meiose voraus (Wu und Ma 2005). Diese konnte für Dahlien jedoch lediglich in niedrigen Frequenzen nachgewiesen werden (Gatt et al. 1998). Kamiri et al. (2010) beobachteten bei interspezifischen Citrushybriden, die ähnlich niedrige Frequenzen an Bivalenten während der Meiose aufweisen, ebenfalls keine Doppelreduktion. Somit scheint diese nicht oder lediglich in einem geringen Maße zu der verschobenen Spaltung in den Populationen K1 und K5 beigetragen zu haben.

Für Polyploide sind eine Reihe weiterer Effekte wie eine erhöhte Transposon-Aktivität und Rekombination zwischen homöologen Chromosomen bekannt, die Abweichungen gegenüber der Vererbung nach Mendel verursachen können (Liu und Wendel 2002). Diese sind teilweise die gleichen Effekte, wie diejenigen die mit der Diploidisierung von Polyploiden und der daraus resultierenden Artenbildung (siehe 1.2.1) einhergehen.

Die Verteilung der Marker in den berechneten Kopplungskarten für die Eltern der Population K5 (siehe 3.3.1 und 3.3.2) deutet zudem darauf hin, dass verschiedene Genomregionen unterschiedliche Rekombinationsraten aufweisen. In Populationen, die auf Kreuzungen zwischen entfernt verwandten Arten zurückzuführen sind, ist häufig eine verminderte Rekombination für bestimmte Genomregionen zu beobachten (Qu und Hancock 1995, Kreike und Stiekema 1997, Lacape et al. 2003). Dies kann zu Abweichungen der Markerspaltungsdaten von den theoretischen Spaltungsverhältnissen führen. Daher könnte die verschobene Spaltung in den Populationen K1 und K5 ebenfalls auf Unterschiede in der Homologie zwischen verschiedenen Bereichen der Genome der Ursprungsarten von *D. variabilis* zurückzuführen sein.

All diese Effekte könnten dazu beigetragen haben, dass viele der Marker in den untersuchten Populationen eine verschobene aufwiesen. Dies könnte dazu geführt haben, dass letztlich disome Spaltungsverhältnisse für die Populationen K1 und K5 nachgewiesen wurden, die fälschlicherweise auf eine Allopolyploidie für die untersuchten Populationen deuten.

4.1.4 Bestätigung der Annahme einer polysomen Vererbung durch das Verhältnis von Singledosemarkern zu Multidosemarkern

Das Verhältnis von Singledose- zu Multidosemarkern ist ein wichtiger Indikator, der häufig für die Unterscheidung zwischen den beiden Ploidietypen Allopolyploid und Autopolyploid herangezogen wird (Da Silva et al. 1993, Qu und Hancock 2001). Deshalb wurden zunächst alle 1334 spaltenden AFLP[®]- und Mikrosatellitenfragmente, welche für die Population K5 ausgewertet wurden, einer der beiden Klassen Singledose- (SD-) oder Multidosemarker (MD-Marker) zugeordnet. Dies erfolgte anhand des geometrischen Mittels. Diese Methode hat Vorteile gegenüber der Zuordnung durch den Chi-Quadrat-Anpassungstest: Der Anteil der Marker, der fälschlicherweise einer der beiden Klassen zugewiesen wird, gleicht sich bei der Zuordnung durch das geometrische Mittel gegenseitig aus. Außerdem müsste für die Unterscheidung zwischen SD- und MD-Markern anhand des Chi-Quadrat-Anpassungstests jeder der Marker auf alle theoretischen Spaltungsverhältnisse geprüft werden. Aufgrund von verschobener Spaltung kann die Aufspaltung der Marker jedoch teilweise stark von den theoretischen Spaltungsverhältnissen abweichen. Bei der Selektion auf Basis des Chi-Quadrat-Anpassungstests könnte für einen Teil der Marker mit verschobener Spaltung daher kein Spaltungsverhältnis nachgewiesen werden. Die entsprechenden Marker würden deshalb keiner der beiden Klassen zugeordnet werden. Dadurch würden sie aus dieser Methode sowie aus den anschließenden Analysen wie der Kartierung ausgeschlossen werden. Im Gegensatz dazu erfolgt bei der Einteilung der ausgewerteten Marker in SD- und MD-Marker durch das geometrische Mittel ein Vergleich der Spaltungsdaten jedes ausgewerteten Markers mit einem Schwellenwert. Dieser stellt den Mittelpunkt zwischen dem Spaltungsverhältnis für SD-Marker und dem Spaltungsverhältnis für die MD-Markerkonstellation eines Duplex-Markers dar. Wird dieser Schwellenwert unterschritten, werden die Marker als SD-Marker klassifiziert. Wird dieser Wert hingegen überschritten, werden die Marker als MD-Marker eingeteilt. Auf diese Weise werden alle Marker, auch solche mit einer verschobenen Spaltung, einer der beiden Klassen zugeordnet und in die Analyse sowie in nachfolgende Methoden einbezogen. Zudem ist für die Unterscheidung zwischen SD- und MD-Markern anhand des geometrischen Mittels nicht von so großen Nachkommenschaften

abhängig wie eine eindeutige Klassifizierung anhand des Chi-Quadrat-Anpassungstests.

Nachdem auf Basis des geometrischen Mittels das Verhältnis von SD- zu MD-Markern für die Population K5 bestimmt wurde, erfolgte ein Vergleich dieses Verhältnisses mit den theoretischen Verhältnissen für Autopolyploide (0,7:0,3) und Allopolyploide (0,56:0,44) anhand des Chi-Quadrat-Anpassungstests. Dabei wichen die, für die Population K5, beobachteten Werte von den theoretischen Werten eines Autopolyploiden mit $\chi^2_{0,95} (df = 1) = 0,03$ nicht signifikant ab. Daher bestätigt das Verhältnis von SD- zu MD-Markern die Hypothese einer Autopolyploidie und steht in Einklang mit den Ergebnissen der Auswertung der Mikrosatelliten-Spaltungsmuster (siehe 4.1.2).

4.1.5 Bestätigung einer oktosomen Vererbung für *Dahlia variabilis* durch das Verhältnis von Attraktionskopplungen zu Repulsionskopplungen

Die präferentielle Paarung zwischen zwei homologen Chromosomen führt zu einer Repulsionskopplung zwischen Markern, die auf den beiden unterschiedlichen Homologen lokalisiert sind (siehe 1.3.2). Daher stellt das Verhältnis von Markern, die in der Attraktionsphase gekoppelt sind, zu Markern, die in der Repulsionsphase gekoppelt sind, ein sicheres Maß für den Grad an präferentieller Paarung zwischen den homologen Chromosomen dar. Somit ermöglicht diese Methode eine eindeutige Unterscheidung zwischen einer disomen und einer polysomen Vererbung. Deshalb wurde das Verhältnis von Attraktionskopplungen zu Repulsionskopplungen für die Population K5 durch einen Kartierungsansatz mit der Software JoinMap Version 4 anhand von insgesamt 569 spaltenden uniparentalen SD-Markern ermittelt (siehe 3.2.4). Das beobachtete Verhältnis von Attraktions- zu Repulsionskopplungen für die Population K5 entsprach dem eines Autopolyploiden mit einer höheren Ploidiestufe als die Tetraploide mit keiner Abweichung ($\chi^2_{0,95} (df = 1) = 0,00$). Dieses Ergebnis deutet darauf, dass die Gartendahlie eine polysome Vererbung und eine höhere Ploidiestufe als ein tetraploider Organismus aufweist. Da eine Hexaploidie auszuschließen ist (siehe 4.1.1), deutet das Ergebnis dieser Untersuchung auf eine oktosome Vererbung für *D. variabilis*.

4.1.6 Zusammenfassung der Genomanalysen von *Dahlia variabilis*

Die Mehrheit der hier angewendeten Methoden zur Bestimmung des Ploidietypus (siehe 3.2.1, 3.2.2, 3.2.4 und 3.2.5) deuten übereinstimmend auf eine oktosome Vererbung für die Gartendahlie. Deshalb lässt sich *D. variabilis* zusammengefasst als ein oktoploider Organismus mit einer polysomen Vererbung beschreiben, der aus Hybridisierungen unterschiedlicher Arten hervorgegangen ist (Lawrence 1929, Hansen und Hjerting 1996) und auf der zytologischen Ebene einen hohen Grad an Diploidisierung aufweist (Lawrence 1929, 1931a, Gatt et al. 1998). Nach Stebbins (1947) entstehen allopolyploide Organismen durch Hybridisierungen unterschiedlicher Arten, bilden während der Meiose hauptsächlich Bivalente und weisen eine disome Vererbung auf. Autopolyploide hingegen entstehen innerhalb einer Art, bilden während der Meiose hauptsächlich Multivalente und haben eine polysome Vererbung.

Werden die Eigenschaften von *D. variabilis* den Definitionen der Ploidietypen von Stebbins (1947) gegenübergestellt, wird ein Konflikt deutlich. Wenn die Entstehung der Gartendahlie als ausschlaggebendes Kriterium für die Klassifizierung des Ploidietypus herangezogen wird, ist sie als ein allopolyploider Organismus einzuordnen. Jedoch weisen Allopolyploide laut Definition nicht wie *D. variabilis* eine polysome, sondern eine disome Vererbung auf. Wird hingegen die Vererbung als entscheidender Parameter für die Unterscheidung des Ploidietypus herangezogen, ist *D. variabilis* als autopolyploider Organismus zu klassifizieren. Jedoch entstehen Autopolyploide nach der Definition von Stebbins (1947) nicht, wie die Gartendahlie, durch die Hybridisierung unterschiedlicher Arten. Demzufolge kann *D. variabilis* keinem dieser beiden Ploidietypen zugeordnet werden, ohne dass die Eigenschaften der Gartendahlie der Definition des jeweiligen Ploidietypus widersprechen.

Bei der Berechnung der Kopplungskarten wurde für die beiden Kartierungseltern jeweils lediglich eine Repulsionskopplung nachgewiesen (siehe 3.3). Dies deutet darauf, dass die entsprechenden Genombereiche einer präferentiellen Chromosomenpaarung unterliegen. Die übrigen 1021 Marker wurden hingegen in der Attraktionsphase kartiert. Deshalb ist davon auszugehen, dass die entsprechenden Genomregionen keiner präferentiellen, sondern einer zufälligen Chromosomenpaarung unterliegen. Daher ist anzunehmen, dass *D. variabilis* unterschiedliche Intensitäten

an präferentieller Chromosomenpaarung für verschiedene Bereiche des Genomes aufweist. Stebbins (1947, 1950) bezeichnete solche Polyploide als segmentale Allopolyploide. Sybenga (1996) unterteilte diese nachträglich abhängig vom Grad an präferentieller Chromosomenpaarung in unterschiedliche Klassen. Jedoch entspricht die Vererbung von *D. variabilis* aufgrund der geringen Anzahl an Markern, die in der Repulsionsphase gekoppelt waren (0,02 %, siehe 3.3), ebenfalls keiner dieser Klassen. Daher scheint *D. variabilis* ein segmentaler allooktoploider Organismus mit einem sehr geringen Grad an präferentieller Chromosomenpaarung zu sein.

4.2 Mögliche Mechanismen zur Förderung von Bivalenten bei *Dahlia variabilis*

Gatt et al. (1998) vermuteten, dass die Wildarten mit $2n = 64$ Chromosomen, sowie die Gartendahlie, über einen Bivalente fördernden Mechanismus verfügen, der dem auf *Ph1*-basierenden Mechanismus des Weizens (*Triticum aestivum*) ähnelt. Dieser Mechanismus unterdrückt die Paarung von homöologen Chromosomen während der Meiose. Dadurch wird eine Rekombination zwischen den unterschiedlichen Ursprungsgenomen des Weizens verhindert und diese bleiben im Genom des Weizens als Subgenome erhalten (Riley und Chapman 1958, Riley et al. 1959). Auf diese Weise ruft dieser Bivalente fördernde Mechanismus eine Diploidisierung auf der zytologischen sowie auf der genetischen Ebene hervor.

Wenn die Gartendahlie über einen solchen Mechanismus verfügen würde, wäre für sie außer einer hohen Frequenz an Bivalenten ebenfalls eine disome Vererbung zu erwarten. Jedoch zeigen die hier angewendeten Methoden (siehe 3.2.2, 3.2.4 und 3.2.5), dass sie stattdessen eine polysome Vererbung aufweist. Somit zeigt die Gartendahlie lediglich auf der zytologischen Ebene, nicht jedoch auf der genetischen Ebene, einen hohen Grad an Diploidisierung. Daher scheint der Bivalente fördernde Mechanismus nicht die gleichen Effekte hervorzurufen, wie der auf *Ph1*-basierende Mechanismus des Weizens.

Feldman et al. (1997) wiesen für den Weizen noch einen zweiten Bivalente fördernden Mechanismus nach. Dieser beruht wahrscheinlich auf dem Ausschluss repetitiver Sequenzabschnitte nach der Entstehung der betroffenen Polyploiden. Dieser Mechanismus ruft anscheinend lediglich eine Diploidisierung auf der zytologischen, nicht jedoch auf der genetischen Ebene hervor, wie es ebenfalls für *D.*

variabilis zu beobachten ist. Daher erscheint es wahrscheinlicher, dass der Bivalente fördernde Mechanismus der Gartendahlie dem Mechanismus des Weizens ähnelt, der auf den Ausschluss repetitiver Sequenzabschnitte basiert.

Aufgrund der Kombination aus einer hohen Frequenz an Bivalenten und einer polysomen Vererbung, ist anzunehmen, dass in den Bivalenten, die während der Meiose der Gartendahlie gebildet werden, keine präferentielle Paarung zwischen den homologen Chromosomen erfolgt. Stattdessen scheinen die homologen und homöologen Chromosomen der unterschiedlichen Ursprungsgenome in Bivalenten intergenomisch miteinander zu paaren und zu rekombinieren.

Aufgrund dieser intergenomischen Rekombination ist davon auszugehen, dass die involvierten Ursprungsarten der Gartendahlie relativ ähnliche Genomstrukturen aufweisen. Deshalb wäre gewöhnlich zu erwarten, dass ihre meiotische Chromosomenpaarung größtenteils in Multivalenten erfolgt. Dabei besteht jedoch das Risiko, dass einzelne Chromosomen während der Meiose als Univalent vorliegen und deshalb anschließend nicht gleichmäßig auf die Gameten verteilt werden können (Pecinka et al. 2011). Auf diese Weise können unbalancierte Gameten entstehen, was zu einer verminderten Fertilität des betroffenen Organismus führen kann. Untersuchungen haben gezeigt, dass die Fertilität bei höheren Frequenzen an Multivalenten während der meiotischen Chromosomenpaarung Einbußen in der Fertilität zur Folge haben (Raina et al. 1994, Ozkan und Feldman 2009).

Daher besteht die Funktion des Bivalente fördernden Mechanismus der Gartendahlie (Gatt et al. 1998) wahrscheinlich darin eine hohe Fertilität zu gewährleisten. Dies wird anscheinend erreicht, indem dieser Mechanismus die meiotische Chromosomenpaarung reguliert und die Ausbildung von Multivalenten zwischen den strukturell sehr ähnlichen homologen bzw. homöologen Chromosomen der unterschiedlichen Ursprungsgenome unterdrückt.

Für weitere Untersuchungen des Bivalente fördernden Mechanismus könnte das Genom einiger *D. variabilis*-Genotypen anhand von Mitosehemmern aufgedoppelt werden um hexadecaploide Dahlien zu erzeugen. Außerdem könnten Hybriden zwischen Arten erzeugt werden deren Genome klar voneinander unterscheidbar sind. Auf diese Weise könnte nachvollzogen werden ob Rekombination zwischen den elterlichen Genomen erfolgt und ob diese mit der Chromosomenpaarung korreliert.

4.3 Rückschlüsse auf die Entstehung von *Dahlia variabilis*

Es ist nicht geklärt, aus welchen Hybridisierungsereignissen die Gartendahlie hervorgegangen ist. Lawrence (1970) vermutete, dass tetraploide Arten hybridisierten und daraus entstandene Hybriden anschließend eine Genomverdopplung vollzogen haben, woraus letztlich *D. variabilis* hervorging. Hansen und Hjerting (1996) hingegen gingen davon aus, dass durch Hybridisierungen oktaploider Genotypen bzw. Arten zunächst *D. pinnata* entstanden ist. Aus dieser Hybride soll letztlich die Gartendahlie hervorgegangen sein.

Bei den hier durchgeführten Mikrosatellitenmarker-Analysen an unterschiedlichen Wildarten und Gartendahliesen (siehe 4.1.1) wurden für *D. pinnata* maximal vier Allele pro Genotyp amplifiziert. Für *D. variabilis* wurden hingegen maximal acht Allele pro Genotyp (durchschnittlich 4,6 Allele; siehe 3.2.1) nachgewiesen. Daher kann *D. variabilis* nicht ausschließlich aus der Hybride *D. pinnata* hervorgegangen sein.

Die Entstehung der Gartendahlie, gleich aus welchen Hybridisierungsereignissen sie hervorging, ist letztlich auf die tetraploiden Wildarten zurückzuführen. Daher müsste der Einfluss der Genomstruktur dieser Arten auf die Vererbung von *D. variabilis* nachweisbar sein.

Aufgrund der hohen Frequenz an Bivalenten während der Meiose der tetraploiden Wildarten nahmen Lawrence (1929) und Gatt et al. (1998) an, dass diese allotetraploid seien. Einige dieser Arten umfassen neben den tetraploiden ebenfalls oktaploide Genotypen. Die Genotypen mit diesen beiden Ploidiestufen weisen innerhalb derselben Art untereinander eine sehr hohe phänotypische Ähnlichkeit auf. Deshalb ist anzunehmen, dass die oktaploiden die autopolyploiden Nachkommen der vermuteten allotetraploiden Genotypen sind (Gatt et al. 1998). Jedoch bilden diese autotetraploiden Genotypen ebenfalls relativ hohe Frequenzen an Bivalenten, wie es für einen autopolyploiden Organismus nicht zu erwarten wäre. Dieser hohe Grad an zytologischer Diploidisierung entspricht für die oktaploiden Arten nicht ihrem Ploidietypus und deutet auf einen Bivalente fördernden Mechanismus hin (Gatt et al. 1998). Wenn die Dahlien über einen solchen Mechanismus verfügen, erscheint es zweifelhaft, anhand ihrer hohen Frequenzen an Bivalenten für die tetraploiden Arten auf eine Allopolyploidie zu schließen. Die hohe Anzahl an Autopolyploiden, die ebenfalls fast ausschließlich Bivalente während der Meiose bilden (Skirm 1942, Ting

et al. 1957, Sreenivasan et al. 1987, Burner 1991, Qu et al. 1998, Eilam et al. 2009), zeigt dass die Charakterisierung der Paarung der Chromosomen nicht für die Klassifizierung des Ploidietypus geeignet ist. Außerdem wurde bereits häufiger angezweifelt, dass die meiotische Chromosomenpaarung einen verlässlichen Indikator für die Unterscheidung zwischen Allo- und Autopolyploiden darstellt (Soltis und Rieseberg 1986, Krebs und Hancock 1989, Sybenga 1996), da sie zudem durch externe Faktoren beeinflusst sein kann (Kamiri et al. 2011). Daher liegt für die tetraploiden Arten kein gesicherter Hinweis auf eine Allopolyploidie vor.

Für einen allopolyploiden Organismus wäre zu erwarten, dass seine Subgenome untereinander Strukturunterschiede in den Chromosomen aufweisen. Gatt et al. (1998) konnten jedoch anhand karyotypischer Untersuchungen der tetraploiden Wildarten solche Unterschiede nicht nachweisen.

Wenn die Ursprungsarten der Gartendahlie tatsächlich allotetraploid wären und demzufolge Subgenome aufweisen würden, die nicht miteinander rekombinieren, wäre dies ebenfalls für *D. variabilis* zu erwarten. Demnach müsste die Gartendahlie eine höhere Frequenz an Markern, die in der Repulsionsphase gekoppelt sind, aufweisen. Dies konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (siehe 3.2.5 und 3.3).

Da ein allopolyploider Organismus per Definition aus der Hybridisierung unterschiedlicher Arten hervorgeht, wäre für diesen ein hoher Grad an Heterozygotie zu erwarten. Dementsprechend müsste anhand der Mikrosatellitenmarker eine relativ hohe Anzahl an Allelen je Genotyp zu detektieren sein. Jedoch wurden durch die Mikrosatellitenmarker für die tetraploiden Wildarten relativ geringe Anzahlen an unterschiedlichen Banden amplifiziert (maximal drei Allele pro Genotyp, durchschnittlich 1,9 Allele; siehe 3.2.1), was auf einen geringen Grad an Heterozygotie und somit auf eine Autopolyploidie für diese Arten hinweist.

Insgesamt deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die tetraploiden Vorfahren von *D. variabilis* autopolyploid und nicht allopolyploid sind. Gatt et al. (1998) vermuteten, dass die oktaploiden Wildarten autopolyploide Nachkommen der tetraploiden Arten sind. Daher scheinen die oktaploiden Wildarten, die als potentielle Vorfahren der Gartendahlie in Frage kommen, ebenfalls autopolyploid zu sein. Demnach können alle potentiellen Ursprungsarten der Gartendahlie ausschließlich autopolyploid gewesen sein.

Da davon auszugehen ist, dass die tetraploiden und oktaploiden Vorfahren der Gartendahlie autopolyploid sind und diese bereits eine stark erhöhte Frequenz an

Bivalenten während der Meiose bilden, ist anzunehmen, dass der Bivalente fördernde Mechanismus (siehe 4.2) bereits bei diesen Arten aktiv ist. Bei diesen Arten scheidet der Mechanismus ebenfalls wie bei *D. variabilis* lediglich eine Diploidisierung auf der zytologischen, nicht jedoch auf der genetischen Ebene hervorzurufen, da davon auszugehen ist, dass diese Arten ebenfalls autopolyploid sind.

Da bei der Berechnung der Kopplungskarten für die Eltern der Population K5 lediglich zwei Marker in der Repulsionsphase kartiert wurden (siehe 3.3), ist anzunehmen, dass die Gartendahlie eine nahezu freie Paarung und Rekombination zwischen den homologen und homöologen Chromosomen aufweist. Dies deutet darauf hin, dass zwischen den unterschiedlichen Ursprungsgenomen von *D. variabilis* keine starken strukturellen Unterschiede bestanden.

Daher ist anzunehmen, dass die Gartendahlie letztlich auf Hybridisierungen zwischen autopolyploiden Genotypen zurückzuführen ist, die relativ ähnliche Genomstrukturen aufwiesen.

Die höheren Anzahlen an amplifizierten Allelen pro Genotyp für die Gartendahlies anhand der Mikrosatellitenmarker im Vergleich zu den Wildarten (siehe 3.2.1) stützen die Hypothese, dass unterschiedliche Wildarten bzw. Genotypen an der Entstehung der Kulturform beteiligt waren (Sørensen 1969, Lawrence 1970, Hansen und Hjerting 1996).

4.4 Genetische Kopplungskarten für die Eltern der Population K5

Die Berechnung der Kopplungskarten für die Eltern der Population K5 erfolgte anhand von 931 uni- und biparentalen SD-Markern aus den 1334 spaltenden AFLP[®]- und Mikrosatellitenfragmenten für diese Population.

Da *D. variabilis* 64 Chromosomen besitzt, wäre zu erwarten, dass beide Kartierungseltern zusammen insgesamt 64 KGs aufweisen. Die hohe Anzahl an berechneten Kopplungsgruppen (73 für Karneol und 78 für Nordlicht) und die, nach Chakravarti et al. (2001) und Stein et al. (2007) ermittelte geringe Abdeckung der Genome (17,62 % für Karneol und 22,43 % für Nordlicht) deuten darauf hin, dass die verwendete Anzahl an Markern nicht ausreicht, um alle Bereiche der Genome beider Kartierungseltern zu erfassen. So wurden auf einigen Kopplungsgruppen (KGs) lediglich zwei

Marker kartiert. Daher ist anzunehmen, dass solche KGs Bruchstücke längerer KGs darstellen, die aufgrund der geringen Markerabdeckung nicht verbunden werden konnten. Bei einer höheren Abdeckung der Kopplungskarten durch eine größere Anzahl an Markern könnten diese wahrscheinlich miteinander zu längeren KGs verknüpft werden. Andere KGs wurden hingegen durch eine wesentlich höhere Anzahl an Markern abgedeckt (siehe 3.3.1 und 3.3.2). Dies weist darauf hin, dass die Rekombinationsrate in den Genomen der Eltern der Population K5 zwischen den unterschiedlichen Genomregionen zum Teil stark variiert. Die Ursache dafür könnte auf Unterschiede in der Homologie zwischen verschiedenen Bereichen der Ursprungsgenome von *D. variabilis* zurückzuführen sein. Dies könnte ebenfalls die Ursache für die beobachtete verschobene Spaltung für einen großen Anteil der ausgewerteten Marker darstellen (siehe 4.1.3). Unterschiede in der Rekombinationsfrequenz für verschiedene Bereiche des Genomes wurden jedoch ebenfalls für viele andere Pflanzenarten nachgewiesen (Mézard 2006, Fregene et al. 1997) und stellen keine Besonderheit für das Dahliengenom dar.

Für die beiden Kartierungseltern wurde jeweils lediglich ein Marker in der Repulsionsphase kartiert (siehe 3.3). Daher ist davon auszugehen, dass lediglich sehr wenige Abschnitte der unterschiedlichen homologen bzw. homöologen Chromosomen der Gartendahlie einem geringen Grad an präferentieller Chromosomenpaarung unterliegen und während der Meiose größtenteils zufällig miteinander paaren. Dies deutet, wie bereits unter 4.3 erwähnt, darauf, dass die unterschiedlichen Ursprungsgenome der Gartendahlie eine recht ähnliche Genomstruktur aufwiesen.

Anhand der Mikrosatellitenmarker DV03 und DV13 wurden für Nordlicht jeweils vier Allele amplifiziert. Für DV13 wurden für Karneol drei Allele detektiert. Die Allele dieser Marker wurden jeweils auf unterschiedlichen KGs in den Homöologengruppen 1 und 2 kartiert (siehe 3.3.3, Tabelle 12). Dies zeigt, dass die Allele der Mikrosatellitenmarker tatsächlich auf unterschiedlichen KGs lokalisiert sind und daher Rückschlüsse auf die Anzahl der homologen bzw. homöologen Chromosomen, sowie deren Paarung während der Meiose zulassen. Da für den Kartierungselter Nordlicht vier und für Karneol drei homologe bzw. homöologe KGs durch einzelne Mikrosatellitenmarker identifiziert werden konnten, ist davon auszugehen, dass bei einer ausreichenden Absättigung der Kopplungskarte durch molekulare Marker wahrscheinlich acht homologe bzw. homöologe KGs nachzuweisen wären. Somit scheinen die Ergebnisse der Kartierung ebenso wie die Ergebnisse der Methoden

zur Bestimmung der Ploidiestufe (siehe 4.1.1 und 4.1.5) auf eine Oktoploidie für *D. variabilis* zu deuten.

Die biparentalen AFLP[®]-Singledosemarker wurden für beide Eltern der Population K5 zumeist in der gleichen Reihenfolge kartiert. Daher ist davon auszugehen, dass die berechneten Kopplungskarten trotz ihrer relativ geringen Abdeckung recht robust sind und die tatsächliche Abfolge der kartierten Marker widerspiegeln.

4.4.1 Identifizierung homologer und homöologer Kopplungsgruppen von *Dahlia variabilis*

Für eine eindeutige Unterscheidung zwischen homologen und homöologen Chromosomen bzw. KGs ist es notwendig, die unterschiedlichen Ursprungsarten des betroffenen polyploiden Organismus in die molekularen Untersuchungen einzu beziehen. Ein Vergleich mit den diploiden Vorfahren erleichtert zudem die eindeutige Identifizierung homologer und homöologer Chromosomen bzw. KGs. Eine Voraussetzung dafür ist, dass die verschiedenen Ursprungsarten anhand der verwendeten molekularen Marker eindeutig unterschieden werden können. Jedoch ist nicht zweifelsfrei geklärt, aus welchen Wildarten *D. variabilis* hervorgegangen ist. Zudem sind die diploiden Vorfahren der Gartendahlie vermutlich ausgestorben (Lawrence 1929). Außerdem scheinen die Ursprungsgenome von *D. variabilis* recht ähnliche Genomstrukturen aufzuweisen, da sie miteinander rekombinieren und nicht als getrennte Subgenome im Genom der Gartendahlie vorliegen (siehe 4.2). Daher ist es anhand der hier angewendeten Methoden nicht möglich, zwischen homologen und homöologen KGs der Gartendahlie zu unterscheiden. Deshalb konnten die identifizierten homologen bzw. homöologen KGs lediglich in Homöologengruppen zusammengefasst, jedoch nicht weiter unterteilt werden.

Anhand der Mikrosatellitenmarker und den biparentalen AFLP[®]-Markern ließen sich übereinstimmend klar voneinander abgegrenzte Homöologengruppen erstellen. Diese Unterteilung der Kopplungsgruppen in Homöologengruppen konnte jedoch durch die Kartierung der MD-Marker nicht bestätigt werden. Zudem wiesen einige der 3:1 spaltenden MD-Marker Kopplungen an bis zu vier KGs auf, obwohl für sie eigentlich eine Duplex-Konstellation zu erwarten wäre. Deshalb wurden die MD-Marker wieder aus den berechneten Karten entfernt und die KGs letztlich

ausschließlich auf Basis der Mikrosatelliten- und biparentalen AFLP[®]-Marker in Homöologengruppen unterteilt.

Möglicherweise war die Kartierungspopulation K5 mit 173 Individuen zu klein, um die MD-Marker fehlerfrei ihrer tatsächlichen Position auf der Karte zuzuordnen. Ein weiterer Grund dafür, dass die MD-Marker anscheinend nicht korrekt kartiert werden konnten, könnte die hohe Anzahl an SD-Markern mit verschobener Spaltung sein. Für die MD-Marker wurden zudem größtenteils disome Spaltungsverhältnisse (siehe 3.2.3) nachgewiesen, obwohl die übrigen der hier angewendeten Methoden für *D. variabilis* auf eine polysome Vererbung deuteten (siehe 3.2.2, 3.2.4 und 3.2.5). Daher scheinen die MD-Marker ebenfalls, wie ein Großteil der SD-Marker, eine verschobene Spaltung aufzuweisen, was die Kartierung der MD-Marker zusätzlich beeinträchtigt haben könnte. Diese Faktoren könnten dazu geführt haben, dass für die MD-Marker letztlich falsch kartiert wurden.

4.5 Marker- Merkmalsassoziationen bei *Dahlia variabilis*

Für die Population K5 wurden 22 phänotypische Merkmale in den drei Umwelten Herrenhausen 2009 (Umwelt 1), Herrenhausen 2010 (Umwelt 2) und auf dem Versuchsgelände der Leibniz Universität Hannover in Ruthe 2010 (Umwelt 3) bonitiert (siehe 2.3). Anhand der erhobenen Daten wurden ein *Kruskal-Wallis*-Test sowie für alle normalverteilten Merkmale ein Permutationstest und ein Interval Mapping, mit der Software MapQTL 6 (Van Ooijen 2009) durchgeführt. Auf diese Weise sollten Marker bzw. Genombereiche der Kopplungskarten für die Eltern der Population K5 auf Assoziationen an die erhobenen Merkmale überprüft werden.

4.5.1 Nachweis von Marker- Merkmalsassoziationen bei *Dahlia variabilis* anhand des *Kruskal-Wallis*-Tests

Anhand des *Kruskal-Wallis*-Tests konnten für die sechs Merkmale Anzahl der Blütenblätter, Blütenstandsdurchmesser, Blattbreite, Blütenstängellänge, Breite der Zungenblüten und Länge der Zungenblüten für mindestens einen Kartierungselter in allen drei Umwelten Assoziationen an die jeweils gleichen Marker nachgewiesen werden (siehe 3.4.1). Für die drei Merkmale Anzahl der Blütenblätter, Blütenstandsdurchmesser und Länge der Zungenblüten konnten Markerassoziationen für die

beiden Kartierungseltern Karneol und Nordlicht über alle drei Umwelten nachgewiesen werden.

Diese relativ hohe Stabilität der detektierten Assoziationen über die unterschiedlichen Umwelten deutet darauf hin, dass die Ausprägung der entsprechenden Merkmale gegenüber den übrigen Merkmalen einem geringeren Einfluss durch Umweltbedingungen unterliegt. Daher scheinen diese Merkmale eine vergleichsweise hohe Heritabilität aufzuweisen. Unter diesen Bedingungen ist eine gezielte Selektion auf die entsprechenden Merkmale sinnvoll, weil ein relativ hoher Selektionserfolg und somit eine Verbesserung der Ausprägung der Merkmale erreicht werden kann (Khan et al. 2010). Da diese Merkmale anscheinend größtenteils durch erbliche Faktoren und nicht durch die Umwelt beeinflusst werden, ist anzunehmen, dass ihre Ausprägung auf das Vorhandensein entsprechender Allele und nicht auf Umweltfaktoren zurückzuführen ist. Deshalb können Merkmale mit einer hohen Heritabilität anhand des Phänotypen selektiert werden. Auf diese Weise können geeignete Kreuzungseltern ausgewählt werden, die Allele aufweisen, welche sich positiv auf die Merkmalsausprägung auswirken. Da davon auszugehen ist, dass Merkmale mit einer hohen Heritabilität in einem geringen Ausmaße durch Umweltfaktoren beeinflusst werden, ist eine erfolgreiche Selektion auf solche Merkmale in einer relativ geringen Anzahl an Umwelten möglich. Außerdem müssen potentielle Sortenkandidaten nicht an einer höheren Anzahl an Standorten auf die Stabilität der Merkmalsausprägung getestet werden wenn die entsprechenden Merkmale eine hohe Heritabilität aufweisen.

Da die hier gezeigten Markerassoziationen an die oben genannten Merkmale über die unterschiedliche Umwelten stabil nachgewiesen werden konnten, könnten die entsprechenden Marker (siehe 3.4.1) für eine Selektion von Kreuzungsnachkommen mit den angestrebten Merkmalsausprägungen genutzt werden. Die ermittelten Marker-Merkmalsassoziationen wurden jedoch bisher lediglich für die Population K5 nachgewiesen. Deshalb müsste zuvor überprüft werden, ob sie ebenfalls für andere Gartendahlienpopulationen stabil sind. Wenn dies zutrifft, könnten die entsprechenden Marker für eine markergestützte Selektion genutzt werden. Dafür könnten aus den Markern sequenzspezifische Marker wie SCAR- (Sequence Characterized Amplified Region) oder CAPS- (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) Marker entwickelt werden, die auf Agarosegelen ausgewertet werden können. Auf diese Weise würde man kostengünstige diagnostische Marker erhalten, die es ermöglichen

könnten, eindeutige Rückschlüsse auf die Ausprägung bestimmter Merkmale von Kreuzungsnachkommen zu ziehen.

4.5.2 Geringe Reproduzierbarkeit der detektierten QTLs für *Dahlia variabilis*

Bei dem Interval Mapping werden im Gegensatz zum *Kruskal-Wallis*-Test ebenfalls die Bereiche zwischen den kartierten Markern auf Korrelationen an die Merkmale überprüft, mit deren Daten sie verrechnet werden. Auf diese Weise können Quantitative Trait Loci (QTLs) identifiziert werden, die Assoziationen an die entsprechenden Merkmale aufweisen.

Anhand des Interval Mappings konnten für die beiden Kartierungseltern Karneol und Nordlicht für einige Merkmale QTLs bei teilweise recht hohen LOD-Werten (bis zu 10,44) berechnet werden. Jedoch war die Reproduzierbarkeit der QTLs über die unterschiedlichen Umwelten gering. So konnte durch das Interval Mapping für die Kartierungsmutter Karneol lediglich für die Blattbreite (auf der KG K44 in der Homöologengruppe 2) und die Anzahl der Blütenblätter (auf der KG K49 in der Homöologengruppe 24), jeweils Assoziationen über die zwei Umwelten 1 und 3 auf denselben KGs nachgewiesen werden. Für den Kartierungsvater Nordlicht wurde durch das Interval Mapping lediglich für das Merkmal Breite der Zungenblüten über die zwei Umwelten 1 und 3 jeweils ein QTL auf derselben KG (N1 in der Homöologengruppe 3) detektiert (siehe 3.4.2). Für diese drei Merkmale Blattbreite, Anzahl der Blütenblätter und Breite der Zungenblüten konnten ebenfalls anhand des *Kruskal-Wallis*-Tests Markerassoziationen über alle drei Umwelten nachgewiesen werden (siehe 3.4.1). Daher scheinen diese Merkmale gegenüber den übrigen Merkmalen einem relativ geringen Einfluss durch die Umweltbedingungen zu unterliegen. Die Konsequenzen für die Selektion auf Merkmale mit einer hohen Heritabilität wurden unter 4.5.1 beschrieben.

Für die Merkmale Pflanzenhöhe und Blattlänge konnten weder durch den *Kruskal-Wallis*-Test noch anhand des Interval Mappings Assoziationen an dieselben Marker bzw. Genomregionen über mehrere Umwelten nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass diese Merkmale eine geringe Heritabilität aufweisen und einem relativ hohen Einfluss durch äußere Faktoren unterliegen. Unter diesen Bedingungen ist es bereits schwer geeignete Kreuzungseltern für eine spaltende Nachkommen-

schaft zu identifizieren. Da die Ausprägung solcher Merkmale stark durch Umweltfaktoren beeinflusst wird, ist für die Selektion auf Merkmale mit einer geringen Heritabilität allgemein eine markergestützte Selektion sinnvoller als eine phänotypische Selektion.

Zudem ist bei der Selektion auf Merkmale mit einer geringen Heritabilität ein geringer Selektionserfolg zu erwarten. Deshalb ist es schwierig eine deutliche Verbesserung der Ausprägung solcher Merkmale zu erzielen. Dafür müssten mehrere aufeinander folgende Selektionsschritte erfolgen (Togashi und Lin 2010). Zudem sollte die Selektion auf Merkmale mit einer geringen Heritabilität generell in möglichst großen Nachkommenschaften an mehreren unterschiedlichen Standorten erfolgen (Meuwissen et al. 2001, Cassell 2009). Auf diese Weise selektierte potentielle Sortenkandidaten sollten anschließend auf die Stabilität der Ausprägung der entsprechenden Merkmale an unterschiedlichen Standorten überprüft werden. Dabei sollte jeweils eine größere Anzahl an Klonen einbezogen werden.

Insgesamt war die Reproduzierbarkeit der detektierten QTLs zwischen den verschiedenen Umwelten recht gering. Dies deutet darauf hin, dass die QTLs anhand des Interval Mappings nicht stabil für die Population K5 kartiert werden konnten. Die nachgewiesenen Marker-Merkmalsassoziationen sollten daher in anderen Dahlien-Populationen verifiziert werden, bevor die entsprechenden Marker für eine markergestützte Selektion in Betracht gezogen werden.

4.5.3 Mögliche Ursachen für die geringe Reproduzierbarkeit der berechneten QTLs

Die geringe Reproduzierbarkeit der QTLs zwischen den unterschiedlichen Umwelten könnte darauf zurückzuführen sein, dass beim Interval Mapping, im Gegensatz zum *Kruskal-Wallis*-Test, die Regionen zwischen den kartierten Markern in die Berechnung der Marker-Merkmalsassoziationen einbezogen werden. Die Abdeckung der berechneten Kopplungskarten (durchschnittlicher Markerabstand 5,2 cM für Karneol und 6,3 cM für Nordlicht; siehe 3.3) könnte daher zu gering sein, um durch das Interval Mapping fehlerfrei Assoziationen an die Ausprägung der entsprechenden Merkmale nachzuweisen, da die detektierten QTLs in zu großen Distanzen zu den kartierten Markern liegen. Zudem ist das Interval Mapping sensitiver als der *Kruskal-Wallis*-Test, weshalb dieser wahrscheinlich nicht so anfällig für Faktoren ist, welche

die Marker-Merkmalsassoziationen in den unterschiedlichen Umwelten beeinflusst haben könnten.

Die geringe Reproduzierbarkeit der durch das Interval Mapping berechneten QTLs für die unterschiedlichen Umwelten deutet auf eine geringe Heritabilität für viele phänotypische Eigenschaften bei *D. variabilis*. Um ein Merkmal unter diesen Voraussetzungen zu kartieren, muss eine relativ große Anzahl von bis zu 1000 Nachkommen in die QTL-Analyse einbezogen werden (Staub et al 1998). Die Ergebnisse des Interval Mappings könnten daher aufgrund der Verwendung einer zu kleinen Nachkommenschaft (173 Nachkommen) verzerrt sein (Melchinger et al. 2004).

Da die Gartendahlie wahrscheinlich eine oktosome Vererbung aufweist (siehe 4.1.6), ist davon auszugehen, dass die entsprechenden Gene bzw. Genomregionen aller beteiligten Ausgangsgenome die Ausprägung der Merkmale beeinflussen. Dies kann zu Dosiseffekten sowie epistatischen Effekten führen, die auf Interaktionen zwischen homologen und zusätzlich zwischen nicht homologen Genen basieren (Eshed und Zamir 1996). Polyploide weisen außerdem häufig weitere Effekte auf, die eine QTL-Kartierung beeinträchtigen können. Ereignisse wie Genomhybridisierungen und Genomdupplungen können zu einer erhöhten Dynamik bzw. Instabilität der Epigenetik sowie zu pleiotropischen Effekten führen. Dies kann die Ausprägung der Merkmale in den unterschiedlichen Umwelten beeinflussen (Adams und Wendel 2005, Fanizza et al. 2005, Verhoeven et al. 2010). Diese Faktoren erschweren es Boniturklassen zu erstellen, welche die genetischen Grundlagen der unterschiedlichen Merkmalsausprägungen tatsächlich erfassen. Dadurch kann die Zuordnung der jeweiligen Merkmalsausprägung in die unterschiedlichen Boniturklassen beeinträchtigt werden.

Für Organismen mit höheren Ploidiestufen und einer polysomen Vererbung, wie sie die Gartendahlie aufweist, sind die Grundlagen für die QTL-Kartierung zudem bisher nicht in vollem Ausmaß erfasst (Cao et al. 2005, Doerge und Craig 2000, Luo et al. 2006, Leach et al. 2010). Die verwendete Software MapQTL 6 (Van Ooijen 2009) wurde für diploide Organismen konzipiert. Wahrscheinlich konnte diese Software daher die polysome Vererbung von *D. variabilis* nicht nachvollziehen und somit die Zusammenhänge der jeweiligen Merkmalsausprägungen nicht stabil über die unterschiedlichen Umwelten in Bezug zu bestimmten Genomregionen bringen.

Beim Interval Mapping wurden auf einigen KGs der Kartierungsmutter Karneol mehrere QTLs für unterschiedliche Merkmale jeweils in den gleichen Bereichen

lokalisiert (siehe 3.4.2). Die Anhäufung verschiedener QTLs in einer Genomregion tritt bei der Berechnung durch das Interval Mapping häufiger auf. Oft beeinflussen QTLs für unterschiedliche Merkmale, die anhand dieser Methode detektiert werden, einander, was es erschwert, die Einflüsse der unterschiedlichen QTLs voneinander zu trennen (Byrne 2007). Dies könnte ebenfalls auf einige der berechneten QTLs, wie beispielsweise für die Merkmale Blütenstängellänge und Pflanzhöhe sowie für die Blattbreite und Blattlänge, die jeweils in den gleichen Regionen kartiert wurden, zutreffen. Da die Ausprägungen dieser Merkmale einander beeinflussen können, konnten die Einflüsse der unterschiedlichen Genomregionen wahrscheinlich nicht klar voneinander getrennt werden, so dass die QTLs letztlich in denselben Bereichen kartiert wurden. Das Auftreten mehrerer QTLs in derselben Genomregion könnte außerdem darauf zurückzuführen sein, dass in den entsprechenden Bereichen Transkriptionsfaktoren lokalisiert sind, welche die Ausprägung mehrerer Merkmale beeinflussen. Außerdem könnten Gene, welche die unterschiedlichen Merkmale regulieren, eng aneinander gekoppelt sein oder einzelne Gene mit pleiotropischen Effekten an ihrer Ausprägung beteiligt sein (Fanizza et al. 2005).

Weitere Gründe für die geringe Reproduzierbarkeit der QTLs über die unterschiedlichen Umwelten könnten auf eine zu geringe Probenzahl sowie auf Fehler bei der Bonitur, die von zwei Personen durchgeführt wurde, zurückzuführen sein.

4.6 Konsequenzen für die Züchtung neuer Dahliensorten

Bisher erfolgt die Züchtung neuer Dahliensorten nach einer recht einfachen Vorgehensweise, indem Sämlinge, die aus Kreuzungen, offenen Abblüten oder aus isolierten Abblüten hervorgehen, selektiert werden. Lediglich Wegner und Debener (2008) sowie Behr und Debener (2004) erarbeiteten Grundlagen für die Entwicklung neuer Zuchtstrategien für Dahlien (siehe 1.1.5).

Für keines der Merkmale, für welche Daten erhoben wurden, konnte ein Spaltungsverhältnis nach Mendel nachgewiesen werden, wie es für ein qualitatives Merkmal zu erwarten wäre. Stattdessen wiesen alle Merkmale eine quantitative Spaltung auf. Anscheinend wird die Ausprägung einzelner Merkmale aufgrund der oktosomen Vererbung von *D. variabilis* jeweils von einer höheren Anzahl orthologer Gene beeinflusst. Zudem deuten die hier erzielten Ergebnisse auf einen hohen Einfluss

von Umweltfaktoren auf die Ausprägung vieler phänotypischer Merkmale bei der Gartendahlie (siehe 4.5.2). Für die Selektion auf Merkmale mit einer geringen Heritabilität ist gewöhnlich ein markergestützter Ansatz einer phänotypischen Selektion vorzuziehen. Jedoch müssen bei der Züchtung neuer Dahliensorten, viele Zuchtziele aufeinander abgestimmt werden, die im Folgenden aufgeführt sind (ergänzt nach Meyer et al. 1999 und nach persönlicher Mitteilung von A. Dohm).

Zuchtziele für die Gartendahlie:

- Blütenfarbe und Farbwirkung
 - o neue Kombinationen
 - o Neuheitenwert
- Form und Größe der Blüte
- Frühblühigkeit
- Blühwilligkeit (Anzahl der Blüten)
- Lange Blühperiode
- Anordnung der Blüten über dem Laub
- Blütenhaltbarkeit
- Farbbeständigkeit auch bei Wind und Regen
- Selbstreinigung der Blüten (Abwerfen welker Blüten)
- Neigungswinkel der Einzelblüte
- Länge und Festigkeit des Blütenstängels
- geringe Pollenbildung
- Habitus
 - o kompakter Wuchs
 - o starke Verzweigung
 - o Aufbau
 - o harmonisches Verhältnis zwischen Habitus und Blüten
- Belaubung
 - o kleinblättrig
 - o Laubfarbe
- Standfestigkeit
- Wuchshöhe
- Widerstandsfähigkeit der Pflanze gegen Witterungseinflüsse
- Wüchsigkeit und Haltbarkeit der Knollen
- Widerstandsfähigkeit gegen Rote Spinne, Virose, Mehltau und andere Krankheiten
- Kühletoleranz

Bei einer Selektion auf eines dieser Zuchtziele anhand molekularer Marker ist es aufgrund der hohen Anzahl an unterschiedlichen Zuchtzielen wahrscheinlich, dass

selektierte Nachkommen den Anforderungen an viele übrige Zuchtziele nicht gerecht werden. Zudem erfordert die Züchtung neuer Dahliensorten eine Selektion in großen Nachkommenschaften, da die Gartendahlie oktaploid ist und eine polysome Vererbung aufweist. Aufgrund dessen ist für eine markergestützte Selektion mit einem hohen Kostenaufwand zu rechnen. Außerdem ist es schwierig Marker zu identifizieren, die eng an ein Merkmal mit einer geringen Heritabilität gekoppelt sind.

Die phänotypische Selektion von Merkmalen kann bei der Gartendahlie in einem relativ frühen Stadium erfolgen und bereitet keinen großen Aufwand. Deshalb erscheint diese Art der Selektion für die Züchtung neuer Dahliensorten sinnvoller als ein markergestützter Ansatz. Bei dieser Vorgehensweise sollten stets relativ große Populationen genutzt werden, da diese für die Selektion von Merkmalen mit einer geringen Heritabilität erforderlich sind (Meuwissen et al. 2001, Cassell 2009).

Anhand der phänotypischen Selektion von Nachkommen mit den erwünschten Merkmalsausprägungen kann langfristig eine schrittweise Akkumulation von Allelen in einem Genpool erzielt werden, die einen positiv Effekt auf die angestrebten Zuchtziele ausüben. Auf diese Weise würde die Züchtung erleichtert werden, da der Anteil der Nachkommen welche die erwünschten Merkmale aufweisen, erhöht werden würde.

Aufgrund des hohen Einflusses der Umweltfaktoren auf viele Merkmale der Gartendahlie, sollten potentielle Sortenkandidaten generell an unterschiedlichen Standorten auf die Stabilität in der Merkmalsausprägung überprüft werden.

Zudem könnte die Heritabilität für die unterschiedlichen phänotypischen Merkmale ermittelt werden. Dafür müssten die entsprechenden Merkmale an mehreren unterschiedlichen Genotypen, von denen jeweils eine höhere Anzahl an Klonen in verschiedenen Umwelten angepflanzt werden, über mehrere Jahre erhoben werden. Anhand der erzielten Ergebnisse könnten für die einzelnen Merkmale Rückschlüsse auf folgende Grundlagen für die Entwicklung von Zuchtstrategien gezogen werden:

- Der jeweils zu erwartende Selektionserfolg, also wie intensiv bzw. wie häufig nacheinander auf ein Merkmal selektiert werden muss.
- Ob die Selektion an mehreren Standorten erfolgen sollte.
- Ob große oder relativ kleine Nachkommenschaften für die Selektion auf das jeweilige Merkmal erforderlich sind.
- Ob eine phänotypische oder eine markergestützte Selektion sinnvoller ist.

Auf diese Weise könnte der Einfluss der Umwelt auf die Ausprägung der einzelnen Merkmale ermittelt werden. Die Herangehensweise bei Merkmalen mit einer geringen bzw. hohen Heritabilität wurde unter den Kapiteln 4.5.1 und 4.5.2 erläutert.

Die in der vorliegenden Arbeit angewendeten Methoden zur Unterscheidung des Ploidietypus deuten für *D. variabilis* auf eine polysome Vererbung hin (siehe 4.1.2, 4.1.4 und 4.1.5). Zudem konnte lediglich jeweils ein Marker für die beiden Kartierungs-eltern in der Repulsionsphase kartiert werden (siehe 3.3). Daher ist für *D. variabilis* nur ein geringer Grad an präferentieller Chromosomenpaarung und eine annähernd freie Rekombination zwischen den homologen und homöologen Chromosomen anzunehmen. Demzufolge dürften keine positiven oder negativen Korrelationen zwischen unterschiedlichen Merkmalsausprägungen bestehen, außer wenn die entsprechenden Loci nahe beieinander auf einer Kopplungsgruppe lokalisiert sind.

Aufgrund der hohen Ploidiestufe in Kombination mit einer polysomen Vererbung ist außerdem die Erzeugung homozygoter Linien der Gartendahlie für die Hybridzüchtung erschwert und würde mehrere aufeinander folgende Selbstungen erfordern. Sogar durch entsprechende *in-vitro*-Techniken sind reine Linien nicht in einem einzelnen Schritt zu erzeugen. Dies würde aufgrund der hohen Ploidiestufe ebenfalls eine wiederholte Anwendung der entsprechenden Techniken erfordern.

Anhand von Transformationen könnten relativ einfach neue Gene wie beispielsweise Resistenzgene oder Gene für weitere Blütenpigmente in das Zuchtmaterial für die Gartendahlie überführt werden. Mii (2012) hat auf diese Weise beispielsweise Dahlien mit blauen Blütenpigmenten erzeugt. Auf diese Weise können theoretisch relativ einfach zusätzliche Merkmale in das Zuchtmaterial überführt werden und für die Züchtung neuer Dahliensorten genutzt werden. Jedoch darf genetisch verändertes Pflanzenmaterial in Europa aufgrund relativ strenger Gentechnik-Gesetze lediglich in sehr seltenen Fällen angebaut bzw. für die Züchtung genutzt werden. Daher stellen transgene Dahlien in Europa keine Alternative zur herkömmlichen Züchtung dar.

4.7 Einsatz neuer Arthybriden für die Züchtung von Dahliensorten

Um neue Merkmale in das Zuchtmaterial für die Gartendahlie zu überführen, wurden Kreuzungen zwischen den Wildarten *D. dissecta* sowie *D. macdougallii* mit der Gartendahlie durchgeführt. Zudem wurde *D. dissecta* auf einem Feld zusammen mit verschiedenen Gartendahliensorten ausgepflanzt, um eine Bestäubung dieser Wildart durch die Gartendahlie zu ermöglichen.

Bei den Kreuzungen zwischen *D. dissecta* und *D. macdougallii* mit der Gartendahlie reagierten die Blüten der Wildarten empfindlich auf eine künstliche Bestäubung und verloren häufig einige Tage nach dieser die unausgereiften Samenkapseln. Deshalb erscheint es für das Einkreuzen von Merkmalen aus Wildarten sinnvoll, diese als Pollenspender und *D. variabilis* als Mutter zu nutzen. Deren Blüten reagierten nicht empfindlich auf die künstliche Bestäubung, wodurch eine höhere Wahrscheinlichkeit besteht, dass Samen ausreifen können. Dieses Vorgehen ist jedoch nur sinnvoll, sofern das entsprechende Merkmal nicht maternal vererbt wird.

Keine der Kreuzungen zwischen der Wildart *D. dissecta* und *D. variabilis* führte zu einem Samenansatz. Gatt et al. (1999) zeigten, dass Kreuzungen zwischen diesen beiden Arten selten fertiles Saatgut hervorbringen. Die Arthybriden, die sie zwischen diesen Arten erzeugen konnten, bildeten während der Meiose viele Univalente, was darauf hindeutet, dass zwischen den Genomen der beiden Ursprungsarten ein geringer Grad an Homologie herrscht. Dies könnte die Ursache dafür sein, dass die hier durchgeführten Kreuzungen zwischen *D. dissecta* und *D. variabilis* sowie die offene Abblüte der Wildart auf dem Feld kein fertiles Saatgut hervorbrachten.

Die Wildart *D. macdougallii* wurde als Kreuzungspartner für die Gartendahlie ausgewählt, da sie ein nicht determiniertes Wachstum der Terminaltriebe aufweist (siehe 3.5). Durch die Kreuzungen mit *D. variabilis* sollte dieses Merkmal in das Zuchtmaterial für die Gartendahlie überführt werden. Zudem sind die Kultur dieser Wildart sowie die Induktion ihrer Blüte recht aufwendig (Hansen und Hjerting 2000), weshalb *D. macdougallii* noch nie für Züchtungszwecke genutzt wurde (Kleinsorge 2004). Außerdem ist diese Wildart in der Natur vom Aussterben bedroht (National Dahlia Society).

Von den erzeugten hexaploiden Arthybriden zwischen *D. macdougallii* und *D. variabilis* wiesen die beiden Genotypen DH2007-415 und DH2007-417 ebenfalls das

nicht determinierte Wachstum der Terminaltriebe auf. Diese Hybriden sind außer den von Lawrence (1931) erzeugten Arthybriden zwischen *D. coccinea* und *D. variabilis* die einzigen nachgewiesenen Dahlien mit dieser Ploidiestufe.

Die Arthybride DH2007-417 brachte ausgepflanzt auf einem Dahlienfeld vier oktoploide Nachkommen hervor. Die 1Cx-Werte (Größe des haploiden Chromosomensatzes; Greilhuber et al. 2005) der Nachkommen der Arthybriden wiesen im Vergleich zu ihren Vorfahren geringe Abweichungen nach unten auf (siehe 3.6). Dies könnte auf Messfehler zurückzuführen sein, da jeweils lediglich eine Messung durchgeführt wurde. Gatt et al. (1999) beobachteten bei Hybriden zwischen unterschiedlichen Dahlienarten den Verlust eines Chromosoms bei einem der von ihnen erzeugten Arthybriden. Dies ist wahrscheinlich auf die hohe Frequenz an Univalenten zurückzuführen, die ebenfalls für diese Arthybriden nachgewiesen wurde. Univalente werden häufig in Folge struktureller Unterschiede zwischen den Ursprungsgenomen von Hybriden gebildet. Chromosomen, die während der Meiose als Univalent vorliegen und demzufolge aus der meiotischen Chromosomenpaarung sowie der Rekombination ausgeschlossen sind, können anschließend nicht gleichmäßig in die Gameten aufgeteilt werden (Pecinka et al. 2011). Dies kann dazu führen, dass unbalancierte Gameten gebildet werden, die unterschiedliche Anzahlen an Chromosomen aufweisen. Daher könnten Unterschiede in den Strukturen der Genome zwischen der Wildart *D. macdougalii* und der Gartendahliesorte Roxy dazu geführt haben, dass die Arthybriden unbalancierte Gameten gebildet haben. Auf diese Weise könnte es bei ihren Nachkommen zum Verlust einzelner Chromosomen gekommen sein, was zu den verminderten 1Cx-Werten gegenüber ihren Vorfahren geführt haben könnte. Dies könnte durch Chromosomenzählungen überprüft werden, welche im Rahmen der vorliegenden Arbeit aus zeitlichen Gründen jedoch nicht mehr durchgeführt werden konnten.

Die Nachkommen der Arthybride DH2007-417 haben bisher keine vollständige Blühphase vollzogen. Daher konnte noch nicht bestimmt werden, ob sie ebenfalls das nicht determinierte Wachstum der Terminaltriebe aufweisen. Deshalb ist bisher nicht eindeutig geklärt, ob diese Genotypen einen direkten Transfer des nicht determinierten Wachstums der Terminaltriebe nach der Blüteninduktion in das Zuchtmaterial für *D. variabilis* ermöglichen. Sollte dies nicht der Fall sein, könnten sie für Rückkreuzungen mit der Wildart *D. macdougalii* oder mit den erzeugten hexaploiden Arthybriden genutzt werden. Dadurch könnten eventuell Genotypen

erzeugt werden, die das nicht determinierte Wachstum der Terminaltriebe stabil ausprägen und so eine Überführung dieses Merkmals in das Zuchtmaterial der Gartendahlie ermöglichen.

4.8 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnten die grundlegenden Eigenschaften der Vererbung der Gartendahlie charakterisiert werden. Jedoch ist diese aufgrund der hohen Ploidiestufe und der polysomen Vererbung recht komplex. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse ist es schwer allgemeine Empfehlungen für die Züchtung neuer Dahliensorten zu erarbeiten.

Um gezielt Zuchtstrategien für die unterschiedlichen Merkmale zu entwickeln, könnte deren jeweilige Heritabilität ermittelt werden. Auf diese Weise lassen sich Rückschlüsse auf die Grundlagen für die Entwicklung neuer Zuchtstrategien ziehen.

Die Marker, für welche in der vorliegenden Arbeit anhand des *Kruskal-Wallis*-Tests über mehrere Umwelten Assoziationen an bestimmte Merkmale nachgewiesen wurden, könnten zudem in anderen Populationen getestet werden, um die Markerassoziationen zu verifizieren. Auf diese Weise könnte die Nutzbarkeit der entsprechenden Marker für die Züchtung neuer Dahliensorten überprüft werden. Um zusätzliche Marker mit engen Kopplungen an die erhobenen Merkmale zu identifizieren und die Lücken der hier berechneten Kopplungskarten zu schließen, müssten weitere Marker kartiert werden.

Außerdem könnte versucht werden, das nicht determinierte Wachstum der Terminaltriebe nach der Blüteninduktion von der Wildart *D. macdougalii* anhand der hier erzeugten Arthybriden und deren Nachkommen in das Zuchtmaterial der Gartendahlie zu überführen. Dadurch könnte dieses Merkmal für die Züchtung neuer Dahliensorten genutzt werden.

5. Literaturverzeichnis

- Adams K. L. and Wendel J. F. (2005). Polyploidy and genome evolution in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 8, 135-141.
- Aitken K. S., Jackson P. A. and McIntyre C. L. (2005). A combination of AFLP and SSR markers provides extensive map coverage and identification of homo(eo)logous linkage groups in a sugarcane cultivar. *Theoretical and Applied Genetics* 110, 789-801.
- AMI Anbauerhebung Frühjahr 2011 (2011).
http://floradania.dk/fileadmin/s3/pdf/Markedsinformation/Tyskland/AMI-Anbauerhebung_PWZ_FrA1_4hjahr_2011_VK.pdf
(Abrufdatum 18.03.2012). Das Dokument ist auf der CD im Anhang hinterlegt.
- Baack E. J. (2004). Cytotype segregation on regional and microgeographic scales in snow buttercups (*Ranunculus adoneus*: *Ranunculaceae*). *American Journal of Botany* 91 (4), 1783-1788.
- Barringer B. C. (2007). Polyploidy and self-fertilization in flowering plants. *American Journal of Botany* 94 (9), 1527-33.
- Behr H. and Debener T. (2004). Novel breeding strategies for ornamental dahlias I: Analysis of the *Dahlia variabilis* breeding system with molecular markers. *European Journal of Horticultural Science* 69 (5), 177-183
- Belling J. (1924). Homologous and similar chromosomes in diploid and triploid hyacinths. *Genetics* 10, 59-71.
- Benson G. (1999). Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Research* 27 (2), 573-580.
- Bertram G. (2000). Untersuchung zur Systematik der Gattung *Dahlia* Cav. Mit molekularen Markern. Diplomarbeit, Institut für Allgemeine Botanik der Universität Hamburg.
- Blakeslee A. F. (1921). Types of mutations and their possible significance in evolution. *The American Naturalist* 5, 254-267.
- Blakeslee A. F. (1934). New Jimson weeds from old chromosomes. *Journal of Heredity* 25, 80-108.
- Burner D. M. (1991). Cytogenetic analyses of sugarcane relatives (*Andropogoneae*: *Saccharinae*). *Euphytica* 54, 125-133.

- Byrne P. (2007). Plant and Soil Sciences eLibrary, USDA National Institute of Food and Agriculture, University of California-Davis.
<http://passel.unl.edu/pages/informationmodule.php?idinformationmodule=1067442598&topicorder=7&maxto=11&minto=1>
(Abrufdatum: 04.04.2011)
- Cao D. C., Osborn T. C. and Doerge R. W. (2004). Correct estimation of preferential chromosome pairing in autotetraploids. *Genome Research* 14, 459-462.
- Cao D. C., Craig B. A. and Doerge R. W. (2005). A model selection based interval-mapping method for autopolyploids. *Genetics* 169, 2371-2382.
- Carson H. (1967). Permanent heterozygosity. *Evolutionary Biology* 1, 143-168.
- Cassell B. (2009). Using heritability for genetic improvement. *Virginia Cooperative Extension* Publication 404-084.
- Castro-Castro A., Rodriguez A., Vargas-Amado G. and Harker M. (2012). Diversity of the genus *Dahlia* (Asteraceae: Coreoideae) in Jalisco, Mexico and description of a new species. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 83, 347-358.
- Cavanilles A. J. (1791). *Icones et descriptiones plantarum*. Preface to vol. 1.
- Chakravarti A., Lasher L. K. and Reefer J. E. (1991). A maximum likelihood Method for estimating genome length using genetic linkage data. *Genetics* 128, 175-182.
- Chaudhary R. (2011). Marker assisted Analysis of the Dahlia Genome. Master of Science Arbeit, Institut für Pflanzengenetik der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover. Das Dokument ist auf der CD im Anhang hinterlegt.
- Clausen J., Keck D. D. and Hiesey W. M. (1945). Experimental studies on the nature of species. II. Plant evolution through amphiploidy and autopolyploidy, with examples from the *Madiinae*. *Carnegie Institution of Washington Publication* 564, 174-176.
- Comai L. (2005). The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nature Reviews Genetics* 6, 836-46.
- Comai L., Tyagi A. P., Winter K., Holmes-Davis R., Reynolds S. H., Stevens Y. and Byers B. (2000). Phenotypic instability and rapid gene silencing in newly formed *Arabidopsis* allotetraploids. *The Plant Cell* 12, 1551-1567.
- Cui L., Wall P. K., Leebens-Mack J. H., Lindsay B. G., Soltis D. E., Doyle J. J. and Soltis P. S. (2006). Widespread genome duplications throughout the history of flowering plants. *Genome Research* 16, 738-749.

- Da Silva J. A. G., Sorrells M. E., Burnquist W. and Tanksley S. D. (1993). RFLP linkage map and genome analysis of *Saccharum spontaneum*. *Genome* 36, 782-791.
- Darlington C. D. (1973). Chromosome botany and the origin of cultivated plants, 237-238. London: George Allen and Unwin Ltd..
- Desfontaines R. L. (1829). *Catalogus plantarum horti regii Parisiensis*. Tableau de l'école de botanique, 3rd ed. Museum national d'Histoire naturelle, Paris.
- D'Hont A. (2005). Unravelling the genome structure of polyploids using FISH and GISH; examples of sugarcane and banana. *Cytogenet Genome Research* 109, 27-33.
- Doerge R. W. and Craig B. A. (2000). Model selection for quantitative trait locus analysis in polyploids. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 7951-7956.
- Doležal J., Sgorbati S. and Lucretti S. (1992). Comparison of three DNA Fluorochromes for Flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. *Physiologia Plantarum* 85, 625-631.
- Doyle G. G. (1963). Preferential pairing in structural heterozygotes of *Zea mays*. *Genetics* 48, 1011-27.
- Doyle J. J., Flagel L. E., Paterson A. H., Rapp R. A., Soltis D. E., Soltis P. S. and Wendel J. F. (2008). Evolutionary genetics of genome merger and doubling in plants. *Annual Review of Genetics* 42, 443-461.
- Eijlander R., Laak W., Hermsen J. G. T., Ramanna M. S. and Jacobsen E. (2000). Occurrence of self-compatibility, self-incompatibility and unilateral incompatibility after crossing diploid *S. tuberosum* (SI) with *S. verrucosum* (SC): I. Expression and inheritance of self-compatibility. *Euphytica* 115 (2), 127-139.
- Eilam T., Anikster Y., Millet E., Manisterski J. and Feldman M. (2009). Genome size in natural and synthetic autopolyploids and in a natural segmental allopolyploid of several Triticeae species. *Genome* 52, 275-285.
- Ern H. (1992). Geschichte und Gliederung der Gattung *Dahlia*. Anonymus: Dahlien - Mexikos Geschenk an die Gärten der Welt, Berlin. Botanischer Garten und Botanisches Museum, 4-10.
- Eshed Y. and Zamir D. (1996). Less-than-additive epistatic interactions of quantitative trait loci in tomato. *Genetics* 143, 1807-1817.
- Fanizza G., Lamaj E., Costantini L., Chaabane R. and Grando M. S. (2005). QTL analysis for fruit yield components in table grapes (*Vitis vinifera*). *Theoretical and Applied Genetics* 111, 658-664.

- Feldman M., Galili G. and Levy A. A. (1986). Genetic and evolutionary aspects of allopolyploidy in wheat. *The Origin and Domestication of Cultivated Plants*, 83-100. Edited by C. Barigozzi. Elsevier, Amsterdam.
- Feldman M., Liu B., Segal G., Abbo S., Levy A. A. and Vega J. M. (1997). Rapid elimination of low-copy DNA sequences in polyploid wheat: a possible mechanism for differentiation of homoeologous chromosomes. *Genetics* 147 (3), 1381-1387.
- Fischer D. and Bachmann K. (1998). Microsatellite enrichment in organisms with Large genomes (*Allium cepa* L.). *Biotechniques* 24, 796-802.
- Fregene M., Angel F., Gomez R., Rodriguez F., Chavarriaga P., Roca W., Tohme J. and Bonierbale M. (1997). A molecular genetic map for cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Theoretical and Applied Genetics* 95, 431-441.
- Galili G. and Feldman M. (1984). Intergenomic suppression of endosperm protein genes in common wheat. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 26, 651-656.
- Gatt M., Ding H., Hammett K. and Murray B. (1998). Polyploidy and evolution in wild and cultivated *Dahlia* species. *Annals of Botany* 81 (5), 647-656.
- Gatt M., Hammett K. and Murray B. (1999). Confirmation of ancient polyploidy in *Dahlia* (Asteraceae) species using genomic in situ hybridization. *Annals of Botany* 84, 39-48.
- Gatt M., Hammett K. and Murray B. (2000). Molecular phylogeny of the genus *Dahlia* Cav. (Asteraceae, Heliantheae-Coreopsidinae) using sequences derived from the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. *Botanical Journal of the Linnean Society* 133 (2), 229-239.
- Gatt M., Hammett K. and Murray B. (2000a). Interspecific hybridization and the analysis of meiotic chromosome pairing in *Dahlia* (Asteraceae-Heliantheae) species with $x = 16$. *Plant Systematics and Evolution* 221, 25-33.
- Gaut B. S. and Doebley J. F. (1997). DNA sequence evidence for the segmental allotetraploid origin of maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, 6809-6814.
- Giannasi D. E. (1975). Flavonoid chemistry and evolution in *Dahlia* (Compositae). *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 102, 404-412.
- Gorman S. W., Banasiak D., Fairley C. and McCormick S. (1996). A 610 kb YAC clone 7 cM of tomato (*Lycopersicon esculentum*) DNA that includes the male sterile 14 gene and a hotspot for recombination. *Molecular Genetics and Genomics* 251, 52-59.

- Grant V. (1981). *Plant Speciation*. New York: Columbia second edition. ISBN 0-231-05113-1.
- Gray A. J. (1986). Do invading species have definable genetic characteristics? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 314, 655-674.
- Greilhuber J., Dolezel J., Lysak M. A. and Bennett M. D. (2005). The origin, evolution and proposed stabilization of the terms 'genome size' and 'C-value' to describe nuclear DNA contents. *Annals of Botany* 95, 255-260.
- Griffiths A. J. F., Gelbart W. M., Miller J. H. and Lewontin R. C. (1999). *Modern Genetic Analysis. Integrating Genes and Genomes*. New York: W H Freeman & Co. ISBN 978-0716743828.
- Grivet L., D'hont A., Roques D., Feldmann P., Lanaud C. and Glaszmann J. C. (1996). RFLP mapping in cultivated sugarcane (*Saccharum* spp): Genome organization in a highly polyploid and aneuploid interspecific hybrid. *Genetics* 142, 987-1000.
- Gottschalk W. (1976). Die Bedeutung der Polyploidie für die Evolution der Pflanzen, 250-252. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart. ISBN: 3-437-30221-3.
- Guerra M. (2008). Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: Concepts and implications. *Genome Research* 120, 339-350.
- Hackett C. A., Milne I., Bradshaw J. E. and Luo Z. (2007). TetraploidMap for Windows: Linkage map construction and QTL mapping in autotetraploid species. *Journal of Heredity* 98, 727-729.
- Hansen H. V. and Hjerting J. P. (1996). Observations on chromosome numbers and biosystematics on *Dahlia* (*Asteraceae*, *Heliantheae*) with an account on the identity of *D. pinnata*, *D. rosea*, and *D. coccinea*. *Nordic Journal of Botany* 16, 445-455.
- Hansen H. V. and Hjerting, J. P. (2000). The early history of the domestication of *Dahlia* (*Asteraceae*, *Heliantheae*) with emphasis on the period 1791-1836 : including observations on taxonomy, chromosome numbers, biochemistry, biosystematics, ray colour inheritance, and ray colour designation within the genus. Publication University of Copenhagen, Botanic Garden. ISBN 8790655087.
- Hansen H. V. (2007). Simplified keys to four sections with 34 species in the genus *Dahlia* (*Asteraceae* - *Coreopsideae*). *Nordic Journal of Botany* 24 (5), 549-554.

- Heesacker A., Kishore V. K., Gao W., Tang S., Kolkman J. M., Gingle A., Matvienko M., Kozik A., Michelmore R. M., Lai Z., Rieseberg L. H. and Knapp S. J. (2008). SSRs and INDELs mined from the sunflower EST database: abundance, polymorphisms, and crosstaxa utility. *Theoretical and Applied Genetics* 117 (7), 1021-1029.
- Howard H. W. (1938). The fertility of amphidiploids from the cross *Raphanus sativus* x *Brassica oleracea*. *Journal of Genetics* 36, 239-273.
- Hillis D. M. and Dixon M. T. (1991). Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *The Quarterly Review of Biology* 66, 411-453.
- Husband B. C. and Schemske D. W. (2000). Ecological mechanisms of Reproductive isolation between diploid and tetraploid *Chamerion angustifolium* (*Onagraceae*). *Journal of Ecology* 88, 689-701.
- Ishikawa M. (1911). Cytologische Studien von Dahlien. *The Botanical Magazine* 25, 1-8.
- Jackson R. C. and Hauber D. P. (1994). Quantitative cytogenetic analysis of autopolyploid and allopolyploid taxa in the *Helianthus ciliaris* group (*Compositae*). *American Journal of Botany* 81, 1063-1069.
- Jakob S. S. and Blattner F. R. (2010). Two extinct diploid progenitors were involved in allopolyploid formation in the *Hordeum murinum* (*Poaceae: Triticeae*) taxon complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 55, 650-659.
- Jannoo N., Grivet L., David J., D'Hont A. and Glaszmann J. C. (2004). Differential chromosome pairing affinities at meiosis in polyploid sugarcane revealed by molecular markers. *Heredity* 93, 460-467.
- Jenczewski E., Eber F., Grimaud A., Huet S., Lucas M. O., Monod H. and Chevre A. M. (2003). *PrBn*, a major gene controlling homeologous pairing in oilseed rape (*Brassica napus*) haploids. *Genetics* 164, 645-653.
- Johnson M. A. T. and Brandham P. E. (1997). New chromosome numbers in petaloid monocotyledons and in other miscellaneous angiosperms. *Kew Bulletin* 52, 121-138.
- Jones A. (1967). Theoretical segregation ratios of qualitatively inherited characters for hexaploid sweetpotato (*Ipomoea batatas*). United States Department of Agriculture, *Technical Bulletin* 1368.
- Khan H. , Rahman H., Ahmed H. and Ali H. (2008). Magnitude of Heterosis and Heritability in Sunflower over Environments. *Pakistan Journal of Botany* 1, 301-308.

- Kamiri M., Stift M., Srairi I., Costantino G., El Moussadik A., Hmyene A., Bakry F., Ollitrault P. and Froehlicher Y. (2011). Evidence for non-disomic inheritance in a Citrus interspecific tetraploid somatic between *C. reticulata* and *C. lemon* hybrid using SSR markers and cytogenetic analysis. *Plant Cell Reports* 30, 1415-1425.
- Kashkush K., Feldman M. and Levy A. A. (2002). Gene loss, silencing and activation in a newly synthesized wheat allotetraploid. *Genetics* 160, 1651-1659.
- Kawuki R. S., Nuwamanya E., Labuschagne M. T., Herselman L. and Ferguson M. E. (2011). Segregation of selected agronomic traits in six S1 cassava families. *Journal of Plant Breeding and Crop Science* 3 (8), 154-160.
- Kellog E. A. (2003). What happens to genes in duplicated genomes?. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 4369-4371.
- Kennedy B., Sabara H., Haydon D. and Husband B. C. (2006). Pollinator-mediated assortative mating in mixed-ploidy populations of *Chamerion angustifolium* (Onagraceae). *Oecologia* 150, 398-408.
- Kihara H. und Ono T. (1926). Chromosomenzahlen und systematische Gruppierung der Rumex-Arten. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie* 4, 475-81.
- Kleinsorge S. A. (2004). Entwicklungsgeschichte und alternative Nutzungsmöglichkeiten von *Dahlia* Cavanilles. Diplomarbeit, Universität Kassel, Ökologische Agrarwissenschaften, Institut für Nutzpflanzenkunde.
- Kosambi D. D. (1944). The estimation of map distance from recombination values. *Annals of eugenics* 12, 172-175.
- Kobayashi N., Horikoshi T., Katsuyama H., Handa T. and Takayanagi K. (1998). A simple and efficient DNA extraction method for plants, especially woody plants. *Plant Tissue Culture Biotech* 4, 76-80.
- Krebs S. L. and Hancock J. F. (1989). Tetrasomic inheritance of isoenzyme markers in the highbush blueberry, *Vaccinium corymbosum* L.. *Heredity* 63, 11-18.
- Kreike C. M. and Stiekema W. J. (1997). Reduced recombination and distorted segregation in a *Solanum tuberosum* (2x) x *S. spegazzinii* (2x) hybrid. *Genome* 40 (2), 180-187.
- Kriegner A., Cervantes J. C., Burg K., Mwanga R. O. M. and Zhang D. P. (2003). A genetic linkage map of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) based on AFLP markers. *Molecular Breeding* 11, 169-185.

- Lacape J. M., Nguyen T. B., Thibivilliers S., Courtois B., Bojinov B. M., Cantrell R. G., Burr B. and Hau B. (2003). A combined RFLP-SSR-AFLP map of tetraploid cotton based on a *Gossypium hirsutum* x *Gossypium barbadense* backcross population. *Genome* 46 (4), 612-626.
- Lander E. S., Green P., Abrahamson J., Barlow A., Daly M. J., Lincoln S. E. and Newburg L. (1987). MAPMAKER: An interactive computer package for constructing primary genetic linkagemaps of experimental and natural populations. *Genomics* 1, 174-181.
- Lawrence W. J. C. (1929). The genetics and cytology of *Dahlia* species. *Journal of Genetics* 21, 125-159.
- Lawrence W. J. C. (1931). The genetics and cytology of *Dahlia variabilis*. *Journal of Genetics* 24, 257-306.
- Lawrence W. J. C. (1931a). The secondary association of Chromosomes. *Cytologia* 2.
- Lawrence W. J. C. and Scott-Moncrieff R. (1935). The genetics and chemistry of flower colour in *Dahlia*: a new theory of specific pigmentation. *Journal of Genetics* 30, 155-226.
- Lawrence W. J. C. (1970). The evolution and history of the *Dahlia*. Leamington, National Dahlia Society, The *Dahlia* Annual, 16-24.
- Leach L. J., Wang L., Kearsey M. J. and Luo Z. W. (2010). Multilocus tetrasomic linkage analysis using hidden Markov chain model. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 4270-4274.
- Lerceteau-Köhler E., Guérin G., Laigret F. and Denoyes-Rothan B. (2003). Characterization of mixed disomic and polysomic inheritance in the octoploid strawberry (*Fragaria x ananassa*) using AFLP mapping. *Theoretical and Applied Genetics* 107, 619-628.
- LICOR-Sequencing Manual (1999). Einführung, LICOR, Inc.
- Liebhard R., Gianfranceschi L., Koller B., Ryder C. D., Tarchini R., Van de Weg E. and Gessler C. (2003). Development and characterisation of 140 new microsatellites in apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Molecular Breeding* 10 (4), 217-241.
- Lipscomb D., Farris J. S., Ka M. and Tehler A. (1998). Support, ribosomal sequences and the phylogeny of the Eukaryotes. *Cladistics* 14 (4), 303-338.
- Liu B. and Wendel J. F. (2002). Non-Mendelian Phenomena in Allopolyploid Genome Evolution. *Current Genomics* 3 (6), 489-505.

- Luo Z. W., Zhang Z., Leach L., Zhang R. M., Bradshaw J. E. and Kearsley M. J. (2006). Constructing genetic linkage maps under a tetrasomic model. *Genetics* 172, 2635-2645.
- Margarido G. R. A., Souza A. P. and Garcia A. A. F. (2007). OneMap: software for genetic mapping in outcrossing species. *Hereditas* 144, 78-79.
- Martinez-Perez E., Shaw P., Reader S., Aragon-Alcaide L., Miller T. and Moore G. (1999). Homologous chromosome pairing in wheat. *The Journal of Cell Science* 112, 1761-1769.
- Masterson J. (1994). Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of angiosperms. *Science* 264, 421-424.
- Mather K. (1936). Segregation and linkage in autotetraploids. *Journal of Genetics* 32, 287-314.
- Mather K. (1957). *The Measurement of Linkage in Heredity*. Methuen & Co. LTD, London.
- McClintock B. (1984). The significance of responses of the genome to challenge. *Science* 226, 792-801.
- Melchinger A. E., Utz H. F. and Schön C. C. (2004). QTL analyses of complex traits with cross validation, bootstrapping and other biometrical methods. *Euphytica* 137, 1-11.
- Meyer A. and Schartl M. (1999). Gene and genome duplications in vertebrates: the one-to-four (-to-eight in Fish) rule and the evolution of novel gene functions. *Current Opinion in Plant Biology* 11, 699-704.
- Meyer B., Otto M. und Südbeck H. (1999). Wie züchtet man neue Dahlien? *Jahrbuch der DDFGG*, 139-144.
- Meuwissen T. H., Hayes B. J. and Goddard M. E. (2001). Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics* 157, 1819-1829.
- Mézard C. (2006). Meiotic recombination hotspots in plants. *Biochemical Society Transactions* 34 (4), 531-534.
- Mii M. (2012). Ornamental Plant Breeding through Interspecific Hybridization, somatic Hybridization and genetic Transformation. *ISHS Acta Horticulturae*, XXIV International Eucarpia Symposium Section Ornamentals: Ornamental Breeding Worldwide, 43-54.
- Nadeau J. H. and Sankoff D. (1997). Comparable rates of gene loss and functional divergence after genome duplications early in vertebrate evolution. *Genetics* 147, 1259-1266.

- National Dahlia Society: <http://www.dahlia-nds.co.uk>. (Abrufdatum: 14.03.2012)
- Nicolas S. D., Leflon M., Monod H., Eber F., Coriton O., Huteau V., Chevre A. M. and Jenczewski E. (2009). Genetic regulation of meiotic cross-overs between related genomes in *Brassica napus* haploids and hybrids. *The Plant Cell* 21, 373-385.
- Ohno S. (1999). Gene duplication and the uniqueness of vertebrate genomes circa 1970-1999. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 10 (5), 517-522.
- Olson M. S. (1997). Bayesian procedures for discriminating among hypotheses with discrete distributions: Inheritance in the tetraploid *Astilbe biternata*. *Genetics* 147, 1933-1942.
- Otto S. P. and Whitton J. (2000). Polyploid incidence and evolution. *Annual Review of Genetics* 34, 401-437.
- Ozkan H. and Feldman M. (2009). Rapid cytological diploidization in newly formed allopolyploids of the wheat (*Aegilops-Triticum*) group. *Genome* 52 (11), 926-934.
- Pearson K. (1900). On the criterion that a given system of deviations from the probable in the case of a correlated system of variables is such that it can be reasonably supposed to have arisen from random sampling. *Philosophical Magazine* 50 (5), 157-175.
- Pecinka A., Fang W., Rehmsmeier M., Levy A. and Mittelsten Scheid O. (2011). Polyploidization increases meiotic recombination frequency in Arabidopsis. *BMC Biology* 9 (1), 24-28.
- Pestsova E. G., Goncharov N. P. and Salina E. A. (1998). Elimination of a tandem repeat of telomeric heterochromatin during the evolution of wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 97, 1380-1386.
- Pikaard C. S. (2001). Genomic change and gene silencing in polyploids. *Trends in Genetics* 17, 675-677.
- Poczai P. and Hyvönen J. (2010). Nuclear ribosomal spacer regions in plant phylogenetics: problems and prospects. *Molecular Biology Reports* 37 (4), 1897-912.
- Prinz K., Schie S., Debener T., Hensen I. and Weising K. (2009). Microsatellite markers for *Spergularia media* (L.) Presl. (*Caryophyllaceae*) and their cross-species transferability. *Molecular Ecology Resources* 9, 1424-1426.

- Pugh T., Fouet O., Risterucci A. M., Brottier P., Abouladze M., Deletrez C., Courtois B., Clement D., Larmande P., N'Goran J. A. and Lanaud C. (2004). A new cacao linkage map based on codominant markers: development and integration of 201 new microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics* 108, 1151-1161.
- Qu L., Hancock J. F. and Whallon J. H. (1998). Evolution in an autopolyploid group displaying predominantly bivalent pairing at meiosis: genomic similarity of diploid *Vaccinium darrowi* and autotetraploid *V. corymbosum* (Ericaceae). *American Journal of Botany* 85, 698-703.
- Qu L. and Hancock J. F. (2001). Detecting and mapping repulsionphase linkage in polyploids with polysomic inheritance. *Theoretical and Applied Genetics* 103, 136-143.
- Qu L. and Hancock J. F. (1995). Nature of 2n gamete formation and mode of inheritance in interspecific hybrids of diploid *Vaccinium darrowi* and tetraploid *V. corymbosum*. *Theoretical and Applied Genetics* 91, 1309-1315.
- Raina S. N., Parida A., Koul K. K., Salimath S. S., Bisht M. S., Raja V. and Khoshoo T. N. (1994). Associated DNA changes in polyploids. *Genome* 37, 560-564.
- Ramsey J. and Schemske D. W. (1998). Pathways, mechanisms and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 29, 477-501.
- Ramsey J. and Schemske D. W. (2002). Neopolyploidy in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 33, 589-639.
- Riley R. and Chapman V. (1958). Genetic control of cytologically diploid behaviour of hexaploid wheat. *Nature* 182, 713-715.
- Riley R., Chapman V. and Kimber G. (1959). Genetic control of chromosome pairing in intergeneric hybrids with wheat. *Nature* 183, 1244-1246.
- Rodzen J. A. and May B. (2002). Inheritance of microsatellite loci in the white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). *Genome* 45, 1064-1076.
- Rousseau-Gueutin M., Lerceteau-Köhler E. and Barrot L. (2008). Comparative genetic mapping between octoploid and diploid *Fragaria* species reveals a high level of colinearity between their genomes and the essentially disomic behavior of the cultivated octoploid strawberry. *Genetics* 179 (4), 2045-2060.
- Rozen S. and Skaletsky H. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in molecular biology* 132, 365-386.

- Saar D. E. and Sørensen P. D. (2000). *Dahlia parvibracteata* (Asteraceae, Coreoideae), a new species from Guerrero, Mexico. *Novon* 10, 407-410.
- Saar D. E. (2002). *Dahlia neglecta* (Asteraceae: Coreoideae), a new species from Sierra Madre Oriental, Mexico. *Sida* 20, 593-596.
- Saar D. E., Sørensen P. D. and Hjerting J. P. (2002). *Dahlia spectabilis* (Asteraceae, Coreoideae), a new species from San Luis Potosi, Mexico. *Brittonia* 54, 116-119.
- Saar D. E., Polans N. O. and Sørensen P. D. (2003a). A Phylogenetic Analysis of the Genus *Dahlia* (Asteraceae) Based on Internal and External Transcribed Spacer Regions of Nuclear Ribosomal DNA. *Systematic Botany* 28 (3), 627-639.
- Saar D. E., Sørensen P. D. and Hjerting J. P. (2003). *Dahlia campanulata* and *D. cuspidata* (Asteraceae, Coreoideae): two new species from Mexico. *Acta Botanica Mexicana* 64, 19-24.
- Saar D. E. and Sørensen P. D. (2005). *Dahlia sublignosa* (Asteraceae): a species in its own right. *Sida* 21, 2161-2167.
- Schuelke M. (2000). An economic method for the fluorescent labelling of PCR fragments. *Nature Biotechnology* 18, 233-234.
- Schilling E. E., Linder C. R., Noyes R. D. and Rieseberger L. H. (1998). Phylogenetic relationships in *Helianthus* (Asteraceae) based on nuclear ribosomal DNA internal spacer region sequence data. *Systematic Botany* 23, 177-187.
- Segraves K. A. and Thompson J. N. (1999). Plant polyploidy and pollination: floral traits and insect visits to diploid and tetraploid *Heuchera grossulariifolia*. *Evolution* 53, 1114-1127.
- Sherff E. E. (1955). *Dahlia*. North American Flora II, part W. New York Botanical Garden, New York, 45-59.
- Skirm G. W. (1942). Bivalent Pairing in an induced tetraploid of *Tradescantia*. *Genetics* 20 (27), 635-640.
- Soltis D. E. and Rieseberg L. H. (1986). Autopolyploidy in *Tolmiea menziesii* (Saxifragaceae): Genetic insights from enzyme electrophoresis. *American Journal of Botany* 73, 310-318.
- Soltis P. S. and Soltis D. E. (2000). The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 7051-7057.

- Soltis D. E. and Soltis P. S. (1993). Molecular data and the dynamic nature of polyploidy. *Critical Reviews in Plant Sciences* 12, 243-273.
- Soltis P. S. and Soltis D. E. (2000). The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92, 7051-7057.
- Soltis D. E., Albert V. A., Leebens-Mack J., Bell C. D., Paterson A., Zheng C., Sankoff D., Kerr Wall P. and Soltis P. S. (2009). Polyploidy and angiosperm diversification. *American Journal of Botany* 96, 336-348.
- Song K., Lu P., Tang K. and Osborn T. C. (1995). Rapid genome change in synthetic polyploids of Brassica and its implications for polyploid evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92, 7719-7723.
- Sørensen P. D. (1969). Revision of the genus *Dahlia* (*Compositae*, *Heliantheae*–*Coreopsidinae*). *Rhodora* 71, 309–365.
- Sørensen P. D. (1970). The *Dahlia*: An early history. *Arnoldia* 30, 121-138.
- Sørensen P. D. (1980). New taxa in the genus *Dahlia* (*Asteraceae*, *Heliantheae*, *Coreopsidinae*). *Rhodora* 81, 353-360.
- Sørensen P. D. (1987). *Dahlia congestifolia*, section *Entemophyllon* (*Asteraceae*: *Heliantheae*, *Coreopsidinae*), new from Hidalgo, Mexico. *Rhodora* 89, 197-203.
- Sreenivasan T. V., Ahloowalia B. S. and Heinz D. J. (1987). *Sugarcane improvement through breeding*. Elsevier, New York, 211-253.
- Stam P. (1993). Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: JoinMap. *The Plant Journal* 3, 739-744.
- Stebbins, G. L. (1947). Types of polyploids, their classification and significance. *Advances in Genetics* 1, 403-429.
- Stebbins G. L. (1950). *Variation and Evolution in Plants*. New York: Columbia.
- Stebbins G. L. (1971). Chromosomal evolution in higher plants. Addison-Wesley, Reading, MA, 124-189. ISBN 0-7131-2287-0.
- Stein J., Pessino S. C., Martínez E. J., Rodríguez M. P., Siena L. A., Quarín C. L. and Ortiz J. P. A. (2007). A genetic map of tetraploid *Paspalum notatum* Flüge (bahiagrass) based on single-dose molecular markers. *Molecular Breeding* 20, 153-166.

- Stift M., Berenos C., Kuperus P. and Van Tienderen P. (2008). Segregation models for disomic, tetrasomic and intermediate inheritance in tetraploids: a general procedure applied to *Rorippa* (Yellow Cress) microsatellite data. *Genetics* 179, 2113-2123.
- Staub J. E. and Horejsi T. (1998). Theoretical expectations for the potential use of genetic markers in marker-assisted selection. *Cucurbitaceae; Evaluation and enhancement of cucurbit germplasm*, 342-349.
- Sundberg S., Cowan C. P. and Turner B. L. (1986). Chromosome counts of Latin American *Compositae*. *American Journal of Botany* 73, 33-38.
- Sybenga J. (1969). Allopolyploidization of autopolyploids I. Possibilities and limitations. *Euphytica* 18, 355-371.
- Sybenga J. (1988). Mathematical models for estimating preferential pairing and recombination in triploid hybrids. *Genome* 30, 745-757.
- Sybenga J. (1996). Chromosome pairing affinity and quadrivalent formation in polyploids: Do segmental allopolyploids exist? *Genome* 39, 1176-1184.
- Temsch E., Greilhuber J., Hammett K. R. W. and Murray B. G. (2008). Genome size in *Dahlia* Cav. (*Asteraceae-Coreopsideae*). *Plant Systematics and Evolution* 276 (3), 157-166.
- The *Arabidopsis* Genome Initiative (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408, 796-815.
- Ting Y. C., Kehr A. E. and Miller J. C. (1957). A cytological study of the sweet potato plant *Ipomoea batatas* (L.) Lam. and its related species. *American Naturalist* 91, 197-203.
- Togashi K. and Lin C. Y. (2010) Theoretical efficiency of multiple-trait quantitative trait loci-assisted selection. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 127, 53-63.
- Turner B. L., Ellison W. L. and King R. M. (1961). Chromosome numbers in the *Compositae* IV. North American species, with phyletic interpretations. *American Journal of Botany* 48, 216-223.
- Ukoskit K. and Thompson P. G. (1997). Autopolyploidy versus allopolyploidy and low-density randomly amplified polymorphic DNA linkage maps of sweetpotato. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 122, 822-828.
- Van Ooijen J. W. (2009). MapQTL[®] 6, Software for the mapping of quantitative trait loci in experimental populations of diploid species. Kyazma B.V., Wageningen, The Netherlands.

- Van Ooijen J. W. (2006). JoinMap[®] 4, Software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations. Kyazma B.V. Wageningen, Netherlands.
- Vanzela A. L. L., Ruas C. F., Oliveira M. F. and Ruas P. M. (2002). Characterization of diploid, tetraploid and hexaploid *Helianthus* species by chromosomebanding and FISH with 45S rDNA probe. *Genetica* 114, 105-111.
- Verhoeven K. J. F., Jansen J. J., van Dijk P. J. and Biere A. (2010). Stress-induced DNA methylation changes and their heritability in asexual dandelions, *New Phytologist* 185, 1108-1118.
- Volkov R. A., Borisjuk N. V., Panchuk I. I., Schweizer D. and Hemleben V. (1999). Elimination and rearrangement of parental rDNA in the allotetraploid *Nicotiana tabacum*. *Molecular Biology and Evolution* 16, 311-320.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van der Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23:4407– 4414.
- Wang Y. and Gu X. (2000). Evolutionary patterns of gene families generated in The early stage of vertebrates. *Journal of Molecular Evolution* 51, 88-96.
- Weber W. E. and Wricke G. (1994). Genetic Markers in Plant Breeding. Advances in Plant Breeding 16, Paul Parey, Berlin, Hamburg. ISBN 978-3489671107.
- Wegner H. and Debener T. (2008). Novel breeding strategies for ornamental dahlias II: Molecular analyses of genetic distances between *Dahlia* cultivars and wild species. *European Journal of Horticultural Science* 73 (3), 97-103.
- Wendel J. F., Schnabel A. and Seelanan T. (1995). Bidirectional interlocus concerted evolution following allopolyploid speciation in cotton (*Gossypium*). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92, 280-284.
- Williams G. K., Kubelik A. R., Livak K. L., Rafalski J. A. and Tingey S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18, 6531-6535.
- Wolfe K. H. (2001). Yesterday's polyploids and the mystery of diploidization. *Nature Reviews Genetics* 2, 333-341.
- Wricke G. and Weber W. E. (1986). Quantitative genetics and selection in plant breeding. Walter de Gruyter, Berlin. ISBN 978-3110075618.

- Wu K.K., Burnquist W., Sorrells M. E., Tew T. L. and Moore P. H. (1992). The detection and estimation of linkage in polyploids using single-dose restriction fragments. *Theoretical and Applied Genetics* 83, 294-300.
- Wu R. L., Gallo-Meagher M., Littell R. C. and Zeng Z. B. (2001). A general polyploid model for analyzing gene segregation in outcrossing tetraploid species. *Genetics* 159, 869-882.
- Wu R. L. and Ma C. X. (2005). A general framework for statistical linkage analysis in multivalent tetraploids. *Genetics* 170, 899-907.
- Zhao X. P., Si Y., Hanson R. E., Crane C. F., Price H. J., Stelly D. M., Wendel J. F. and Paterson A. H. (1998). Dispersed repetitive DNA has spread to new genomes since polyploid formation in cotton. *Genome Research* 8, 479-492.

6. Anhang

Tabelle 19: verwendete Sorten, Genotypen und Dahlienwildarten

Bezeichnung	Anzahl Chromosomen
Karneol	64
M 331-6	64
Nordlicht	64
Roxy	64
T8	64
<i>D. australis</i>	64
<i>D. coccinea</i>	64
<i>D. pinnata</i> (rot)	64
<i>D. pinnata</i> (pink)	64
<i>D. sorensenii</i>	64
<i>D. merkii</i>	36
<i>D. dissecta</i>	34
<i>Helianthus annuus</i> RHA 280	34
<i>Helianthus annuus</i> RHA 801	34
<i>Helianthus annuus</i>	34
<i>Helianthus annuus</i>	34
<i>D. australis</i>	32
<i>D. brevis</i>	32
<i>D. coccinea</i> BKGP	32
<i>D. coccinea</i> (W 124)	32
<i>D. excelsa</i>	32
<i>D. imperialis</i>	32
<i>D. rudis</i>	32
<i>D. tubulata</i>	32
DH 2007-415 (Hybrid)	unbekannt
DH 2007-417 (Hybrid)	unbekannt
DH 2007-420 (Hybrid)	unbekannt

Tabelle 20: Spaltungsverhältnisse für Tetraploide

Parentale Konstitution	Tetrasom	Disom 4x
Aa Aa x Aa Aa ¹	35:1	15:1
Aa Aa x Aa aa	11:1	7:1
Aa aa x Aa aa	3:1	3:1
Aa aa x aa aa	1:1	1:1
AA aa x AA aa ²	35:1	1:0
AA aa x aa aa	5:1	1:0
Aa Aa x aa aa	5:1	3:1

1 = für Allopolyploide; AaAa = dominante Allele befinden sich auf homologen Chromosomen

2 = für Allopolyploide; AAaa = dominante Allele befinden sich auf homologen Chromosomen

Tabelle 21: Spaltungsverhältnisse für Oktoploide

Parentale Konstitution	Oktosom	Disom 8x
AAAAaaaa x AAaaaaaa	-- ¹	63:1
AAAAaaaa x AAAaaaaa	--	63:1
AAAAaaaa x Aaaaaaaa	--	31:1
AAaaaaaa x Aaaaaaaa	--	15:1
AAAAaaaa x Aaaaaaaa	--	31:1
AAAAaaaa x aaaaaaaa	69:1	15:1
AAaaaaaa x Aaaaaaaa	27:1	15:1
AAaaaaaa x Aaaaaaaa	25:3	7:1
AAAAaaaa x aaaaaaaa	13:1	7:1
AAaaaaaa x aaaaaaaa	11:3	3:1
Aaaaaaaa x Aaaaaaaa	3:1	3:1
Aaaaaaaa x aaaaaaaa	1:1	1:1

1 = Spaltungsverhältnisse höher 63:1 wurden nicht aufgeführt;
Tabelle nach Lerceteau-Köhler et al. (2003)

Tabelle 22: Genotypen, die aus den Analysen ausgeschlossen wurden

Genotypen ausgeschlossen
K5-61
K5-65
K5-82
K5-105
K5-116
K5-119
K5-120
K5-122
K5-124
K5-125
K5-126
K5-129
K5-138
K5-185

Tabelle 23: verwendeter Bakterienstamm für die Klonierung von PCR-Produkten

Bezeichnung	Genotyp	Hersteller
<i>E. coli</i> DH10B	F-, mcrA, Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC), Φ 80dlacZ Δ M15, Δ lacX74, deoR, recA1, endA1, araD139, Δ (ara, leu)7697, galU, galK, λ -, rpsL, nupG (GibcoBRL)	Invitrogen

Tabelle 24: RAPD Primersequenzen, die für den 454-Sequenzierungsansatz amplifiziert wurden

Bezeichnung	Primersequenz
B7	5'-GGTGACGCAG-3'
C7	5'-GTCCCGACGA-3'
K15	5'-CTCCTGCCAA-3'
L5	5'-ACGCAGGCAC-3'
R3	5'-ACACAGAGGG-3'
R5	5'-GACCTAGTGG-3'
R7	5'-ACTGGCCTGA-3'
R11	5'-GTAGCCGTCT-3'
R16	5'-CTCTGCGCGT-3'
R20	5'-ACGGCAAGGA-3'
S3	5'-CAGAGGTCCC-3'
T4	5'-CACAGAGGGA-3'
T19	5'-GTCCGTATGG-3'
U6	5'-ACCTTTGCGG-3'
U11	5'-AGACCCAGAG-3'

**Tabelle 25: Für den Transfer getestete
Mikrosatellitenmarker von
Heesacker et al. (2008)**

Marker	Amplifikate
HT284	unspezifisch
HT292	polymorph
HT303	kein Produkt
HT323	unspezifisch
HT330	kein Produkt
HT341	kein Produkt
HT359	monomorph
HT379	kein Produkt
HT394	unspezifisch
HT406	monomorph
HT432	unspezifisch
HT447	kein Produkt
HT451	unspezifisch
HT488	kein Produkt
HT493	kein Produkt
HT500	unspezifisch
HT533	unspezifisch
HT571	kein Produkt
HT664	kein Produkt
HT673	unspezifisch
HT692	monomorph
HT700	unspezifisch
HT711	kein Produkt
HT744	unspezifisch
HT804	unspezifisch
HT834	kein Produkt
HT847	unspezifisch
HT875	unspezifisch
HT882	monomorph
HT889	unspezifisch
HT990	kein Produkt
HT1006	kein Produkt

Tabelle 26: Oligonukleotide, die als Adaptoren für die Ligation der DNA-Fragmente verwendet wurden

Bezeichnung	Sequenz	Hersteller
MSE + A Oben	5 '-GAC GAT GAG TCC TGA GTA AA-3 '	MWG Biotech GmbH
MSE + A Unten	5 '-TAC TCA GGA CTC ATA-3 '	MWG Biotech GmbH
Adapter HindIII + A Oben	5 '-CTC GTA GAC TGC GTA CCA-3 '	MWG Biotech GmbH
Adapter HindIII + A Unten	5 '-AGC TGG TAC GCA GTC TAC A-3 '	MWG Biotech GmbH

Tabelle 27: Oligonukleotide, die für die Präamplifikation der AFLP[®]-Marker verwendet wurden

Bezeichnung	Sequenz	Hersteller
MSE + A	5 '-GAC GAT GAG TCC TGA GTA AA-3 '	MWG Biotech GmbH
HindIII + A	5 '-AGA CTG CGT ACC AGC TTA-3 '	MWG Biotech GmbH

Tabelle 28: Oligonukleotide, die für die Endreaktion der AFLP[®]-Marker verwendet wurden

Bezeichnung	Sequenz	Hersteller
MSE + A	5 '-GAC GAT GAG TCC TGA GTA AA-3 '	MWG Biotech GmbH
HindIII + A	5 '-AGA CTG CGT ACC AGC TTA-3 '	MWG Biotech GmbH

Tabelle 29: angewendete AFLP[®]-Primerkombinationen

H700AAC_MAGCA ¹	H700ACGT_MACCG	H800ACA_MAAGG	H800ATG_MAGCA
H700AAC_MATGA	H700ACGT_MACGG	H800ACA_MACAC	H800ATG_MAGTC
H700AAC_MATTA	H700ACGT_MAGCA	H800ACA_MACAG	H800ATG_MATAG
H700AAT_MACCT	H700ACGT_MAGTC	H800ACA_MACCA	H800ATG_MATCG
H700AAT_MACGG	H700ACGT_MATAG	H800ACA_MACCT	H800ATG_MATGG
H700AAT_MAGAG	H700ACGT_MATCG	H800ACA_MACTG	H800ATT_MAAGG
H700ACGT_MAAGG	H700ACGT_MATGA	H800ACA_MAGCA	H800ATT_MAAT
H700ACGT_MACAC	H700ACGT_MATGG	H800ACA_MATGA	H800ATT_MACCG
H700ACGT_MACAG	H700ACGT_MATTA	H800ATG_MACAG	H800ATT_MACGG
H700ACGT_MACAT	H700ACTG_MAGAG	H800ATG_MACCG	H800ATT_MAGAG

¹ = Beispiel für die Bezeichnung der Primerkombinationen: H700AAC_MAGCA = HindIII-Primer IRD-700 markiert mit der drei selektiven Basen A, A und C; MseI-Primer mit den vier selektiven Basen A, G, C und A.

Tabelle 30: verwendete Puffer und Lösungen

Puffer	Zusammensetzung
TE-Puffer	10mM TrisHCl pH 8,0 1mM EDTA pH 8,0
1x TAE-Puffer	40mM Tris base 1mM EDTA pH 8,0
1x TBE-Puffer	89 mM Tris base 89 mM Borsäure 2 mM EDTA pH 8,0
1 x Williams Puffer	10 mM Tris pH 8,3 50 mM KCl 2 mM MgCl ₂ 0,001 % Gelatine
10 x Ladepuffer für Agarose Gelelektrophorese	0,25 % (w/v) Bromphenolblau 30 % Glycerin
Ladepuffer PAA-Gele	98 % Formamid 10mM EDTA pH 8,0 0,05 % Pararosanilin
Kobayashi Puffer 1 zur DNA-Extraktion	50 mM Tris-HCL (pH8,0) 5mM EDTA 350 mM Sorbitol 1 % (v/v) Mercaptoethanol 10 % (w/v) PEG 8000 (autoklavieren)
Kobayashi Puffer 2 zur DNA-Extraktion	50 mM Tris-HCL (pH8,0) 5mM EDTA 350 mM Sorbitol 1 % (v/v) Mercaptoethanol 1 % (w/v) Natriumsacrosyl 710 mM NaCl 0,1 % (w/v) CTAB (autoklavieren)
RL-Puffer	100 mM Tris HCl 100 mM Magnesiumacetat 500 mM Kaliumacetat 50 mM DTT Dithiothreitol pH 7,5

Tabelle 31: verwendete Geräte

Bezeichnung	Hersteller	Modell
Doppellasersequenziersystem	Licor	DNA Analyzer 4200 und 4300
Elektroporationsgerät	BioRad	Micropulser
Elektroporationsküvetten	Invitrogen	E-cuvets 0,1cm
Geldokumentationssystem	Intas	Intas GDS
Gelelektrophoresekammer	MWG Biotech	
Inkubationsschüttler	Incutec	IH50
Magnetrührer	IKA, IDL GmbH	Ikamag RET, Hotplate stirrer
Minispin	Neolab	C1301
Multipipetten	Eppendorf	Multichannel8
pH-Messgerät	Hanna Instruments	pH211 Microprocessor pH Meter
Photometer	LAT, Safas	
Pipetten	Gilson	
Reinstwasseranlage	Sartorius	arium G11
Replicationsstempel	Sigma	Replica plater
Schüttler	Edmund Bühler	Swip KS-10
Schwingmühle	Retsch, Qiagen	Tissue Lyser 2
Thermocycler	Peqlab	Primus 96 advanced Gradient
Thermocycler	Biometra	T Gradient
Vertikale Elektrophoresesysteme	Owl, Biometra	Maxigel
Vortex	VWR international	444-1372
Waagen	Sartorius, Mettler	Universal, AE260 Delta Range
Wärmeschrank	Memmert	
Wasserbad	LAT	W16
Zentrifugen	Hettich, Eppendorf	Rotina 420R, Universal 32R, 5415 D

Tabelle 32: Herstellerstandorte der verwendeten Geräte

Hersteller	Standort	Land
Biometra	Jena, Göttingen	D
BioRad	München	D
Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf	D
Edmund Bühler	Hechingen	D
Eppendorf	Hamburg	D
GATC Biotech AG	Konstanz	D
Gilson	Middleton	UK
Hanna Instruments	Woonsocket	USA
Hettich Zentrifugen	Tuttlingen	D
IDL GmbH	Nidderau	D
IKA	Wilmington	USA
Incutec	North Carolina	USA
Invitrogen	Karlsruhe	D
Klasmann/Deilmann GmbH	Geeste	D
LAT	Hannover	D
Licor	Lincoln	USA
MWG Biotech	Ebersberg	D
Memmert	Schwabach	D
Mettler	Greifensee	S
Neolab	Heidelberg	D
Nerbe plus	Winsen/Luhe	D
Peqlab Biotechnologie	Erlangen	D
Promega	Mannheim	D
Qiagen	Hilden	D
Retsch	Haan	D
Roche Diagnostics	Mannheim	D
Roth	Karlsruhe	D
Sarstedt	Nürnbergrecht	D
Sartorius	Göttingen	D
Selekta/Klemm	Stuttgart	D
Sigma-Aldrich	St. Louis	USA
VWR international	West Chester	USA

Tabelle 33: Angaben zu den entwickelten Mikrosatellitenmarkern; Annealingtemperaturen, Primersequenzen, Motive und Fragmentgrößen

Bezeichnung	°C	Vorwärtsprimersequenz	Rückwärtsprimersequenz	Motiv	Größe (bp)
DV01	53	5'-AGACCTGACCCAATGGAGA-3'	5'-CTTCGCCTCCTCTAGGGTTT-3'	(GA) 30,5 imperfekt	300-325
DV02	58	5'-AAAGTCATCAATCATTCTGCAA-3'	5'-TGAGACGCAGAATAATGCAAA-3'	(GT)57,5 imperfekt	325-350
DV03	55	5'-TCGTGTATAGGAAGCCAAAGAA-3'	5'-TGTC AATTTGGAGTTTGTGAAGA-3'	(GA)24 (GT)6 imperfekt zusammengesetzt	230-320
DV04	53	5'-ACTTATCGGCTGCTTTAGCC-3'	5'-GGCCCCATCATTGTGTTTTTA-3'	(AG)14 imperfekt	285-300
DV05	55	5'-TTCCCAATTCAAAGGATCA-3'	5'-TTCCAGCCATTCAATTCCTC-3'	(GT)15 imperfekt zusammengesetzt	170-190
DV06	53	5'-CAGAATTTGGTGGTCATGTATGT-3'	5'-CCGAAACGCTTTAATACTCTTG-3'	(TTAAAA)9,3 imperfekt	250-270
DV07	55	5'-GGAAAAGCAGGTGCCATAAA-3'	5'-CTCCACTCAATATCCACGTTCA-3'	(TAGGGT)9,3 imperfekt	380-410
DV08	53	5'-TCCCAGCTGTGGTATTCTAGG-3'	5'-TCAGCCACATTCTTCCATGA-3'	(TTA)10 perfekt	550-600
DV09	50	5'-TCCTGCCACCTGTGTTATTG-3'	5'-GGCCGGTTATGAGACTGAAA-3'	(TTC) 25 imperfekt	198-253
DV10	50	5'-GTGGATGTGCGAAACAACAC-3'	5'-GCTGTGGAATGAGCCAAC-3'	(AAAAAATAA)5 perfekt	165-225
DV11	55	5'-TTACGTCCTTTTGGCTAACGA-3'	5'-GAAGGGATTTTGGTCAACGA-3'	(AAAAAACT)4,4 imperfekt	140-170
DV12	60	5'-GGACGCATCAATTGCTGATA-3'	5'-GGAAAAGCAGGTGCCATAAA-3'	(TAACCC)6,3 imperfekt	220-240
DV13	53	5'-AGCCGAGCCTTTACAACACTGA-3'	5'-TCGGAATTGGAATGGGTAA-3'	(AAAAAAAT) 5,8 perfekt	355-380
HT 292	55	5'-ACTGTCAACACCTCCTTCGACT-3'	5'-GGCTTACACTTCTCTCCATCTCAA-3'	(TC)5 perfekt	280-385

**Tabelle 34: LOD-Werte der berechneten
Kopplungsgruppen der
Kartierungsmutter Karneol**

KG ¹ Nr.	LOD-Wert	KG Nr.	LOD-Wert
K1	8	K38	7
K2	8	K39	7
K3	8	K40	5
K4	6	K41	9
K5	9	K42	9
K6	9	K43	9
K7	6	K44	6
K8	7	K45	6
K9	7	K46	5
K10	7	K47	6
K11	9	K48	4
K12	9	K49	6
K13	8	K50	6
K14	6	K51	9
K15	6	K52	8
K16	8	K53	4
K17	5	K54	7
K18	7	K55	9
K19	9	K56	4
K20	6	K57	9
K21	5	K58	5
K22	5	K59	5
K23	5	K60	7
K24	8	K61	4
K25	5	K62	6
K26	7	K63	8
K27	6	K64	6
K28	7	K65	6
K29	8	K66	5
K30	7	K67	3
K31	8	K68	3
K32	6	K69	3
K33	9	K70	3
K34	7	K71	3
K35	7	K72	3
K36	6	K73	5
K37	7	K74	2

1 = Kopplungsgruppe

**Tabelle 35: LOD-Werte der berechneten
Kopplungsgruppen des
Kartierungsvaters Nordlicht**

KG ¹ Nr.	LOD-Wert	KG Nr.	LOD-Wert
N1	10	N40	9
N2	10	N41	6
N3	10	N42	6
N4	10	N43	6
N5	10	N44	6
N6	9	N45	6
N7	9	N46	7
N8	9	N47	6
N9	9	N48	6
N10	9	N49	9
N11	9	N50	8
N12	8	N51	7
N13	8	N52	6
N14	8	N53	6
N15	9	N54	6
N16	8	N55	9
N17	8	N56	5
N18	9	N57	5
N19	9	N58	6
N20	9	N59	6
N21	9	N60	7
N22	7	N61	5
N23	9	N62	5
N24	9	N63	9
N25	7	N64	5
N26	7	N65	5
N27	8	N66	4
N28	7	N67	9
N29	7	N68	4
N30	7	N69	4
N31	7	N70	4
N32	7	N71	5
N33	6	N72	4
N34	7	N73	4
N35	9	N74	8
N36	7	N75	3
N37	9	N76	5
N38	7	N77	4
N39	6	N78	9

1 = Kopplungsgruppe

Tabelle 36: Unterteilung der Kopplungsgruppen der Kartierungsmutter Karneol in Homöologengruppen

KG ¹ Nr.	Zuordnung	KG Nr.	Zuordnung
K1	NA ²	K38	NA
K2	NA	K39	NA
K3	HG ³ 2	K40	HG20
K4	NA	K41	HG21
K5	HG4	K42	HG22
K6	HG8	K43	HG2
K7	NA	K44	HG2
K8	HG9	K45	HG1
K9	NA	K46	HG6
K10	HG1	K47	NA
K11	HG10	K48	HG23
K12	HG4	K49	HG24
K13	HG4	K50	NA
K14	HG9	K51	HG25
K15	HG1	K52	HG26
K16	HG3	K53	HG6
K17	HG3	K54	NA
K18	HG11	K55	27
K19	NA	K56	HG5
K20	HG12	K57	HG28
K21	NA	K58	NA
K22	NA	K59	NA
K23	4	K60	NA
K24	NA	K61	HG1
K25	HG13	K62	NA
K26	HG1	K63	HG5
K27	HG14	K64	HG29
K28	NA	K65	NA
K29	HG15	K66	NA
K30	HG16	K67	NA
K31	HG17	K68	HG23
K32	HG17	K69	NA
K33	NA	K70	NA
K34	HG18	K71	HG3
K35	HG3	K72	HG1
K36	HG19	K73	NA
K37	HG1	K74	NA

1 = Kopplungsgruppe

2 = Kopplungsgruppe wurde keiner Homöologengruppe zugeordnet

3 = Homöologengruppe

4 = Kopplungsgruppe konnte nicht dargestellt werden (siehe 3.3.1)

**Tabelle 37: Unterteilung der Kopplungsgruppen
des Kartierungsvaters Nordlicht
in Homöologengruppen**

KG ¹ Nr.	Zuordnung	KG Nr.	Zuordnung
N1	HG ³	N40	HG13
N2	HG1	N41	NA
N3	HG10	N42	HG3
N4	HG7	N43	NA
N5	HG13	N44	HG3
N6	HG17	N45	HG3
N7	NA ²	N46	HG17
N8	NA	N47	HG2
N9	HG24	N48	HG12
N10	HG27	N49	NA
N11	HG15	N50	HG7
N12	HG4	N51	HG1
N13	HG12	N52	NA
N14	HG7	N53	HG1
N15	HG16	N54	HG11
N16	NA	N55	HG25
N17	NA	N56	HG1
N18	NA	N57	NA
N19	HG2	N58	HG3
N20	HG2	N59	NA
N21	HG4	N60	HG26
N22	HG2	N61	HG19
N23	HG22	N62	HG3
N24	HG3	N63	HG21
N25	HG3	N64	HG9
N26	NA	N65	HG14
N27	HG29	N66	HG2
N28	NA	N67	HG28
N29	HG1	N68	HG8
N30	HG2	N69	HG1
N31	HG1	N70	NA
N32	HG23	N71	NA
N33	NA	N72	NA
N34	HG1	N73	NA
N35	HG4	N74	HG5
N36	HG2	N75	HG20
N37	HG2	N76	HG18
N38	NA	N77	NA
N39	NA	N78	HG6

1 = Kopplungsgruppe

2 = Kopplungsgruppe wurde keiner Homöologengruppe zugeordnet

3 = Homöologengruppe

Lebenslauf

Geburtsdatum: 15.10.1978
Geburtsort: Wolfsburg
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Ausbildung

2010/01 - heute Promotionsstudium, Abteilung Molekulare Pflanzenzüchtung des Institutes für Pflanzengenetik der Leibniz Universität Hannover
Promotionsthema: Charakterisierung der Genomstruktur polyploider Dahlien mithilfe molekularer Marker. Betreuer Prof. Dr. Th. Debener

seit 2007/01 Teilnahme am Zuchtprogramm für Gartendahlien, finanziert über ein Stipendium des privaten Dahlienzüchters Prof. M. Otto und seiner Frau E. Otto (Lüneburg)
Abteilung Molekulare Pflanzenzüchtung des Institutes für Pflanzengenetik der Leibniz Universität Hannover

1999/09 Abitur, Gymnasium des Kooperativen Schulzentrums Kreuzheide in Wolfsburg, Deutschland

Praktika

2003/08-2003/10 Institut für Marktanalyse und Agrarhandelspolitik der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL heute JKI), Braunschweig

2003/04-2003/08 Institut für Pflanzenernährung und Bodenkunde der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL heute JKI), Braunschweig

2002/08-2002/09 Institut für Pflanzenschutz im Gartenbau der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (BBA heute vTI), Braunschweig

2000/08-2000/10 Gartenbauschule Lieven, Wolfsburg

1999/06-1999/09 Gärtnerei der Diakonischen Betriebe Kästorf im Bereich Zierpflanzenbau und Berufsschule, Gifhorn

Veröffentlichungen

Schie S., Debener T. (2013). The generation of novel species hybrids between garden dahlias and *Dahlia macdougalii* to increase the gene pool for variety breeding. *Plant Breeding*, DOI: 10.1111/pbr.12034.

Baier C., Guicking D., Prinz K., Fey-Wagner C., Wöhrmann T., Weising K., Debener T., **Schie S.** and Blattner F. (2009). Isolation and characterization of eleven new microsatellite markers for *Macaranga* (*Euphorbiaceae*). *Molecular Ecology Resources* 9, 1049-1052.

Prinz K., **Schie S.**, Debener T., Hensen I. and Weising K. (2009). Microsatellite markers for *Spergularia media* (L.) Presl. (*Caryophyllaceae*) and their cross-species transferability. *Molecular Ecology Resources* 9: 1424-1426.

Prinz K., Hensen I., **Schie S.**, Debener T. and Weising K. (2009). Microsatellite markers for the tetraploid halophyte *Suaeda maritima* (L.) Dumort. (*Chenopodiaceae*) and cross-species amplification in related taxa. *Molecular Ecology Resources* 9, 1247-1249.

Erklärung zur Dissertation

gemäß § 6 Abs. 1 PromO der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
für die Promotion zum

Dr. rer. nat.

Ich erkläre, dass ich meine Dissertation mit dem Titel

Charakterisierung polyploider Dahlien mit Hilfe molekularer Marker

entsprechend der Vorgaben des § 6 Abs. 1 S. 2 d) PromO verfasst habe.

Diese sind im Einzelnen:

1. die Regeln der geltenden Promotionsordnung zu kennen und eingehalten zu haben und mit einer Prüfung nach den Bestimmungen der Promotionsordnung einverstanden zu sein,
2. die Dissertation selbst verfasst zu haben (Selbstständigkeitserklärung), keine Textabschnitte von Dritten oder eigener Prüfungsarbeiten ohne Kennzeichnung übernommen und alle benutzten Hilfsmittel und Quellen in der Arbeit angegeben zu haben,
3. Dritten weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Vermittlungstätigkeiten oder für die inhaltliche Ausarbeitung der Dissertation erbracht zu haben (d.h. die wissenschaftliche Arbeit ist weder in Teilen noch in Gänze von Dritten gegen Entgelt oder sonstige Gegenleistung erworben oder vermittelt worden),
4. die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine andere Prüfung eingereicht zu haben,
5. die gleiche oder eine in wesentlichen Teilen ähnliche Arbeit ist nicht bei einer anderen Fakultät oder bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht worden. Eine andere Abhandlung wurde nicht als Dissertation anderswo eingereicht und ggf. mit welchem Ergebnis,
6. damit einverstanden zu sein, dass die Dissertation einer Überprüfung der Einhaltung allgemein geltender wissenschaftlicher Standards unterzogen wird, insbesondere auch unter Verwendung elektronischer Datenverarbeitungsprogramme.

Datum, Ort und Unterschrift

Name (in Druckbuchstaben)

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Professor Michael Otto und seiner Frau Elisabeth Otto, nicht nur für die finanzielle Unterstützung, welche die vorliegende Arbeit erst ermöglicht hat, sondern auch dafür, dass Sie mich so herzlich in diesem Projekt aufgenommen haben und in vielerlei Hinsicht unterstützt haben. Zudem bin ich Ihnen für die einmaligen und unvergesslich schönen Stunden auf dem Feld dankbar.

Herrn Professor Thomas Debener danke ich für die Bereitstellung des Themas und die hervorragende kompetente fachliche sowie persönliche Betreuung und für unzählige hilfreiche Anregungen in vielerlei Hinsicht.

Frau PD Dr. Hohe danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Bei Hilke Wegner bedanke ich mich herzlich für die Hilfe im Labor und dafür, dass Sie mich als ihren Nachfolger ausgesucht hat.

Des Weiteren danke ich besonders Dr. Marcus Linde und Maik Klie für die kritische Durchsicht meines Manuskriptes, viele hilfreiche Verbesserungsvorschläge sowie unzählige anregende Diskussionen.

Weiterhin gilt mein Dank Dr. Ann Kathrin Münnekhoff, Dr. Diro Terefe, Dr. Dietmar Schulz, Dr. Frank Schaarschmidt, Dörthe Musmann, Astrid Henz, Ingrid Robotta, Anja Biber, Bettina Winnat, Prof. Dr. Traud Winkelmann, Ulrich Lohmüller, Matthias Stümper, Sieke Schaepe, Galina Malarenko, Kathleen Prinz, Annette Bartkiewicz, Fredericke Busse, Enzo Klein, Max Kohlenberg, Beate Thal und Rajiv Chaudary für die Unterstützung im Labor sowie für die schöne gemeinsame Zeit.

Außerdem danke ich Prof. Hans von Hansen vom Botanischen Garten Kopenhagen, Dr. Andrea Dohm von der Selecta Klemm GmbH & Co. KG, Frau Verbeek von der Deutschen Dahlien-, Fuchsien- und Gladiolen-Gesellschaft eV., Herrn Ritschel vom Dahlienzentrum in Bad Köstritz, Familie Panzer von der Gärtnerei Panzer in Bad Köstritz und Peter Ambrosius für das Bereitstellen von Pflanzenmaterial und Fachliteratur sowie für die Unterstützung in allen übrigen Bereichen.

Besonders danke ich meinen Eltern Dagmar und Helmut Schie, meinem Bruder Matthias Schie, meiner Großmutter Hildegard Wolf und den übrigen Mitgliedern meiner Familie sowie meinen Freunden Kevin Rox, Mike Ehrlich, Marco Hellmuth, Riccardo Kunze, Peter Schleicher und Clemens Groth für den Halt und die Unterstützung über all die Jahre.