

Lehrstuhl für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung  
der Technischen Universität München

**Genomkartierung des Leins (*Linum usitatissimum* L.)  
mit molekularen Markertechniken unter Einbeziehung von  
QTLs für das Fettsäuremuster im Samenöl**

**Michael Klocke**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Landwirtschaft und Gartenbau der  
Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktors der Naturwissenschaften**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. B. Hock  
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. G. Wenzel  
2. Univ.-Prof. Dr. G. Forkmann

Die Dissertation wurde am 13.04.2000 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät für Landwirtschaft und Gartenbau am 18.07.2000 angenommen.



**Hans Kolzem (†)**



Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 1996 bis März 2000 am Lehrstuhl für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung der Technischen Universität München-Weihenstephan angefertigt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. G. WENZEL, daß er mir das Thema dieser Arbeit zur selbständigen Bearbeitung überlassen hat, sowie für sein Engagement für die finanzielle Seite dieses Projektes.

Herrn Prof. Dr. G. FORKMANN danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Frau Dr. U. FREI möchte ich vielmals für die hervorragende Projektleitung danken. Ohne sie wäre dieses Projekt weder zustande gekommen noch durchführbar gewesen.

Zu Dank verpflichtet bin ich außerdem Herrn Prof. Dr. W. FRIEDT, Justus-Liebig-Universität Gießen, und Herrn Prof. Dr. S. KNAPP, Oregon-State-University, USA, welche uns die Kartierungspopulationen zur Verfügung stellten, ebenso wie Herrn H. BUSCH, DSV Thüle, und Herrn Dr. C. MÖLLERS, Universität Göttingen, für die Durchführung der Fettsäure-Analysen.

Frau S. BARTH, Herrn Dr. A. LÖSSL, Herrn W. SCHENKEL und Herrn G. STERN danke ich vielmals für die ständige Diskussionsbereitschaft und die konstruktiven Anregungen sowie für viele motivationsfördernde ‚Fachsimpeleien‘ über wissenschaftsnahe und -ferne Themen.

Vielmals danken möchte ich auch Frau M. AMMERSEDER, Herrn A. BARTH, Frau H. FRÖHLICH, Frau H. GLÖCKNER und Frau A. WINTERSTEIN für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre sowie für die technische Unterstützung bei diversen Gelegenheiten.

Für die überaus kritische Durchsicht dieser Arbeit danke ich Frau K. MENGELE. *Explicit* danken möchte ich auch Herrn C. SCHILLER, welcher mich im Rahmen eines freiwilligen Praktikums tatkräftig unterstützte. Desweiteren danke ich ebenfalls allen weiteren derzeitigen sowie ehemaligen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung.

Mein persönlicher Dank für die stetige Unterstützung und Motivation gilt meinen Eltern sowie den „Münsteranern“: Herrn T. KÜHLKAMP, Herrn A. OPOLKA, Frau A. SCHNEIDER und Frau B. TILP.

*Last but not least* danke ich dem 1. FC TRANSGEN PFLANZENZÜCHTUNG für die Erhöhung meiner persönlichen ‚Fitness‘.

Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Fördernr. Fr1227/1-1) und der Technischen Universität München finanziell unterstützt.



## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	Der Kulturlein ( <i>Linum usitatissimum</i> L. subsp. <i>usitatissimum</i> )	1
1.2	<b>Genetische Marker</b>	<b>13</b>
1.2.1	Morphologische Marker	13
1.2.2	Marker auf physiologischer Ebene	17
1.2.3	Molekulare Marker	19
1.3	<b>Kartierung des pflanzlichen Genoms</b>	<b>27</b>
1.3.1	Kartierungspopulationen	27
1.3.2	Genomische Karten	29
1.3.3	Kartierung von quantitativen Eigenschaften (QTLs)	30
1.4	<b>Analyse der genetischen Diversität</b>	<b>34</b>
1.4.1	Distanzberechnungen	34
1.4.2	Clusteranalyse	36
1.5	<b>Ziele dieser Arbeit</b>	<b>38</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>40</b>
2.1	<b>Pflanzenmaterial</b>	<b>40</b>
2.1.1	Sortenmaterial	40
2.1.2	Population I [Szegedi62 x Atalante]	41
2.1.3	Population II [Viking x McGregor-E1747]	41
2.2	<b>Molekulare Analyse</b>	<b>43</b>
2.2.1	DNA-Extraktion	43
2.2.2	RAPD-Analyse	43
2.2.3	ISSR-Analyse	44
2.2.4	AFLP-Analyse	45
2.3	<b>Fettsäure-Analyse</b>	<b>50</b>
2.4	<b>Datenverarbeitung und Auswertung</b>	<b>51</b>
2.4.1	Diversitätsanalyse	51
2.4.2	Analyse der molekularen Marker auf gestörte Spaltung	52
2.4.3	Erstellung der Kopplungskarten	52
2.4.4	Analyse der phänotypischen Variation innerhalb der Kartierungspopulation	53
2.4.5	QTL-Berechnung	54

---

<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>56</b>
<b>3.1</b>	<b>Diversitätsanalyse</b>	<b>56</b>
<b>3.2</b>	<b>Erstellung der Kopplungskarten</b>	<b>60</b>
3.2.1	Population I [Szegedi62 x Atalante]	60
3.2.2	Population II [Viking x McGregor-E1747]	65
3.2.3	Berechnung von Konsensus-Kopplungsgruppen	69
<b>3.3</b>	<b>Kartierung von polygenen Eigenschaften</b>	<b>74</b>
3.3.1	Population I [Szegedi62 x Atalante]	74
3.3.2	Population II [Viking x McGregor-E1747]	86
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>97</b>
<b>4.1</b>	<b>Die genetische Diversität innerhalb der Kultursorten des Leins</b>	<b>97</b>
<b>4.2</b>	<b>Die Genomkartierung mittels molekularer Marker</b>	<b>100</b>
4.2.1	Das Spaltungsverhalten der Marker	100
4.2.2	Größe und Umfang der vorgestellten Kopplungskarten	102
4.2.3	Die Kartierung von monogenen Eigenschaften	106
4.2.4	Möglichkeiten zur Berechnung einer Konsensus-Kopplungskarte	108
4.2.5	Die Effektivität der verschiedenen Markertechniken	110
<b>4.3</b>	<b>QTL-Analysen bei <i>Linum usitatissimum</i> L.</b>	<b>113</b>
4.3.1	Die züchterische Bedeutung der Regulation der Fettsäure-Biosynthese	113
4.3.2	Korrelation der Merkmale „Relativer Gehalt an Linol- und Linolensäure im Samenöl“	113
4.3.3	Korrelation der Merkmale „Relativer Gehalt an Palmitin-, Stearin- und Ölsäure im Samenöl“	116
4.3.4	Vergleich der beiden Populationen	117
4.3.5	Ausblick	122
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>124</b>
<b>6</b>	<b>ABSTRACT</b>	<b>126</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>128</b>



---

<b>8</b>	<b>ANHANG</b>	<b>140</b>
<b>8.1</b>	<b>Standard-Lösungen</b>	<b>140</b>
<b>8.2</b>	<b>Pflanzenmaterial</b>	<b>142</b>
8.2.1	Population I	142
8.2.2	Population II	143
<b>8.3</b>	<b>RAPD-Primer</b>	<b>144</b>
8.3.1	Übersicht über alle getesteten RAPD-Primer	144
8.3.2	Zur Kartierung der Population I [Szegeedi62 x Atalante] verwendete RAPD-Primer	146
<b>8.4</b>	<b>ISSR-Primer</b>	<b>147</b>
<b>8.5</b>	<b>AFLP-Primer</b>	<b>148</b>
<b>8.6</b>	<b>Steuerungsparameter des ABI 377 Prism DNA Sequencers</b>	<b>149</b>
<b>8.7</b>	<b>Steuerungsparameter des Gaschromatographen</b>	<b>150</b>
8.7.1	Analyse 1	150
8.7.2	Analyse 2	151
<b>8.8</b>	<b>Ergebnisse der Fettsäureanalyse</b>	<b>152</b>
8.8.1	Population I [Szegeedi62 x Atalante]	152
8.8.2	Population II [Viking x McGregor-E1747]	155
<b>9</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>157</b>



## 1 EINLEITUNG

### 1.1 Der Kulturlein (*Linum usitatissimum* L. subsp. *usitatissimum*)

„Der Flachsbaue steht im höchsten Ansehen, denn der Flachs ist die schönste und edelste Frucht, die der Bauer ernten kann. Wenn der Flachs gedeiht, ist das Jahr gut, und solange die Frucht auf dem Felde steht, bis lange nachdem sie geborgen und geliefert ist, ist sie der Stolz eines jeden Bauern. Denn nach seinem Flachs wird er beurteilt und kommt zu Ehren bei den Dorfgenoßenen.

[...]

Abends im Wirtshaus wurde über den Stand der Saaten und das Wachstum geredet, und bei jeder Begegnung zwischen Bauer und Landmann war nach dem „Guten Tag“ die erste Frage „Wie steht der Flachsacker?“ Der Flachs beschäftigte und bekümmerte sie am meisten. Der Flachs galt mehr als alles andere in der Landwirtschaft.“\*

Bis zum Anfang des 20. Jahrhunderts war der Anbau von Flachs bzw. Kulturlein (*Linum usitatissimum* L. subsp. *usitatissimum*) zur Faser- oder Ölsaatengewinnung in ganz Europa verbreitet. Leinen stellte das bedeutendste Textilprodukt der abendländischen Welt dar. Im deutschsprachigen Raum lagen die Hauptanbauggebiete von Flachs vorallem in Westfalen, Schwaben und Schlesien. In diesen Gebieten konnte sich ebenfalls eine blühende Verarbeitungsindustrie etablieren, welche in den meist ländlich strukturierten Gebieten einen bedeutenden Wirtschaftsfaktor darstellte. Der Flachsanbau nahm eine wichtige Stellung im bäuerlichen Alltag ein und übte einen entsprechend großen Einfluß auf das Leben der ländlichen Bevölkerung aus.

Die Familie der Leingewächse (Linaceae) gehört zur Ordnung der Geraniales und umfaßt weltweit 22 Gattungen. Die Gattung *Linum* selbst besteht aus ca. 200 Arten, welche überwiegend in den gemäßigten bis subtropischen Gebieten der nördlichen Halbkugel beheimatet sind. Der einzige wirtschaftlich genutzte Vertreter dieser Gattung ist der Kulturlein *Linum usitatissimum* L. subsp. *usitatissimum* (dt.: „der überaus nützliche Lein“). Desweiteren werden einzelne *Linum*-Arten, wie z.B. *L. perenne* L., auch als Zierpflanzen angebaut.

Der Kulturlein läßt sich in mehrere Formenkreise einteilen, die sich nach dem Habitus sowie nach der Art der Nutzung unterscheiden (SCHILLING 1944, KULPA & DANNERT

\* aus: S. Streuvels: *De Vlaschaard*, Amsterdam 1907

1961). Die urtümlichsten Formen, die Springleine, besitzen Kapseln, welche sich nach der Samenreife öffnen. *Faserleine*, umgangssprachlich auch als Flachs bezeichnet, umfassen hochwachsene (> 100 cm) Sorten mit einer erst im Kronenbereich einsetzenden Verzweigung. Die Samen sind klein und haben nur einen geringen Ölgehalt. Das Produkt der Faserleine ist ausschließlich die stark zellulosehaltige Pflanzenfaser. Deutlich von den Faserleinen unterscheiden sich die *Ölleine*. In der Umgangssprache werden letztere auch einfach als Lein bezeichnet. Im Unterschied zu Faserleinen besitzen *Ölleine* eine geringere Wuchshöhe. Die Verzweigung setzt schon basal ein und ist im Kronenbereich stärker als bei Faserleinen ausgeprägt. *Ölleine* zeichnen sich durch einen reichen Fruchtansatz aus. Der Same ist größer und auch ölreicher als bei Vertretern der erstgenannten Typen. Häufig ist bei *Ölleinen* die Samenschale ungefärbt. Dadurch ist der Same hellbeige anstatt dunkelbraun. Im allgemeinen lassen sich Leinsorten entweder nur zur Faser- oder nur zur Ölgewinnung nutzen, da, abgesehen von den morphologischen Voraussetzungen der jeweiligen Sorten, während der Samenreife die Faserqualität abnimmt. Aus diesem Grund ist eines der Ziele in der Leinzüchtung die Entwicklung von Kombinationsorten, den *Ölfaserleinen*, welche sowohl eine hohe Samen- als auch Faserleistung zeigen.

Der Anbau von Kulturlein läßt sich bis in die Jungsteinzeit zurückverfolgen. Der Kulturlein gehört damit neben Weizen (in Form von Einkorn und Emmer), Gerste, Hirse, Erbse und Linse zu den ältesten Nutzpflanzen der Menschheit (VAN ZEIST & BAKKER-HEERES 1975). Die frühesten Funde von kultivierten Leinsamen belegen den Anbau von Lein für die mesopotamische Hochkultur. Die Funde der Ausgrabungsstätten Ali Kosh (Iran) und Ramad (Syrien) wurden auf ca. 7.500 bis 6.750 v. Chr. datiert (DAMBROTH & SEEHUBER 1988).

Als Stammform des Kulturleins wird der schmalblättrige oder blasse Lein *L. usitatissimum* subsp. *angustifolium* (HUDS.) THELL. angesehen (DIEDRERICHSEN & HAMMER 1994). Er ist zugleich der einzige wildwachsende Vertreter der Art *L. usitatissimum* L. Das Verbreitungsgebiet des schmalblättrigen Leins liegt im gesamten Mittelmeerraum und in den südlichen Regionen von England und Irland. Nach HARLAN (1986) fand die Domestikation parallel in verschiedenen Regionen statt. Als Diversitätszentren werden Zentralasien, der mittlere Osten, das Mittelmeergebiet sowie die europäisch-sibirische Region (ehem. UdSSR) angesehen (VAVILOV 1950, ZEVEN & DE

WET 1982). In Europa scheint der Kulturlein wohl zuerst in der Form eines Winter-Ölleins domestiziert worden zu sein, während in der europäisch-sibirischen Region sommer-blühende Faserleine entwickelt wurden. Letztere scheinen dann die frühen europäischen Formen, vielleicht im Zuge veränderter agronomischer Anforderungen, verdrängt zu haben (DIEDRERICHSEN & HAMMER 1994). Die Mutation der Subspecies *angustifolium* zu der Subspecies *usitatissimum* scheint durch eine einzige Translokation bedingt zu sein (GILL & YERMANDOS 1967).

Erste Zeugnisse einer Faserverarbeitung finden sich seit 5.000 v. Chr. in Ägypten. Wandmalereien aus dem 3. Jahrtausend v. Chr. zeigen die Ernte und Verarbeitung des Leins (DILLMANN 1953). Leinenbinden wurden u.a. zur Einbalsamierung der Mumien verwendet. Öllein lässt sich seit der V. Dynastie (2.563 - 2.423 v. Chr.) nachweisen. Das alte Testament erwähnt Leinen an 22 Stellen (FAWZI 1980).

In Europa wurde der Lein ab dem Jungneolithikum (ca. 4.100 - 3.500 v. Chr.) angebaut. In den Pfahlbautenkulturen in Deutschland und der Schweiz finden sich Leinsamen in allen Kulturhorizonten bis hin zur Bronzezeit (SCHLICHTHERLE 1989). Während der Bronzezeit ebenso wie im Mittelalter war die Leinpflanze der wichtigste Lieferant von Pflanzenfasern.

In der Neuzeit wurde jedoch immer mehr auf den Anbau von Lein verzichtet. Die Mechanisierung der Landwirtschaft bewirkte eine Verdrängung des handarbeitsintensiven Leins durch einfacher zu bearbeitende Fruchtarten wie z.B. Getreide. Gegen Ende des 19. Jahrhunderts erwies sich zudem die Baumwolle für eine industrielle Nutzung als besser geeignet. Der großflächige Anbau von Baumwolle sowie deren industrielle Verarbeitung ermöglichte die Herstellung von kostengünstigen Textilprodukten, welche das Leinen innerhalb weniger Jahrzehnte vollständig ersetzten. Ab 1945 wird der Lein in Deutschland nur noch vereinzelt angebaut.

Seit Mitte der siebziger Jahre wird die Möglichkeit industrielle Rohstoffe durch pflanzliche Erzeugnisse zu ergänzen, wenn nicht sogar zu ersetzen, intensiv diskutiert. Gleichzeitig gewinnt der Anbau solcher „nachwachsender“ Rohstoffe im Zuge von wirtschaftspolitischen wie auch ökologischen Überlegungen immer mehr an Bedeutung. Sowohl für Leinöl als auch für die Leinfasern wurden vielfältige industrielle Nutzungsmöglichkeiten entwickelt (Abb. 1).

Während in der Vergangenheit die Leinzüchtung überwiegend auf die Verbesserung der Faserleistung ausgerichtet war, wird in jüngster Zeit verstärkt die Züchtung neuer Ölleinsorten betrieben. Insbesondere die Modifikation des Fettsäuremusters in Abhängigkeit auf die spätere industrielle Verwertung des Leinöls stellt ein wichtiges Zuchtziel in der Leinzüchtung dar.

<u>Öllein</u>	<u>Faserlein</u>
Speiseöle	Gewebe: - Textilien
Industrieöle: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Farben</li> <li>- Lacke</li> <li>- Bodenbeläge (<i>Linoleum</i>)</li> <li>- PVC-Stabilisatoren</li> <li>- Weichmacher</li> </ul>	Formteile: - Plastikersatz - recyclebare Anwendungen
Leinsamen: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Lebensmittel</li> <li>- Medizin</li> <li>- diätische Ernährung</li> </ul>	Zellulose: - Spezialpapiere
Preßrückstände: - Viehfutter	Asbestersatz
	Mulch
	Dämmstoffe

**Abb. 1:** Beispiele für eine industrielle Nutzung der Produkte der Leinpflanze.

Im Leinöl sind fünf verschiedene Fettsäuren in unterschiedlichen Anteilen nachweisbar (Tab. 1). Die Anteile der einzelnen Fettsäuren in den Triacylglycerolen können in guter Näherung nach dem Modell von EVANS et al. (1969) geschätzt werden (BICKERT 1994).

**Tab. 1:** Übersicht über die Fettsäuren im Leinöl.

wiss. Name	dt. Name	engl. Name	Abk.	Molekularformel
Palmitat	Palmitinsäure	Palmitic acid	C <sub>16:0</sub>	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> COOH
Stearat	Stearinsäure	Stearic acid	C <sub>18:0</sub>	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>16</sub> COOH
Oleat	Ölsäure	Oleic acid	C <sub>18:1</sub>	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> COOH
Linolat	Linolsäure	Linoleic acid	C <sub>18:2</sub>	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH=CHCH <sub>2</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> COOH
Linolenat	Linolensäure	Linolenic acid	C <sub>18:3</sub>	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH=CHCH <sub>2</sub> CH=CH- CH <sub>2</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> COOH

Im allgemeinen Sprachgebrauch hat sich die deutsche Nomenklatur etabliert, so daß im folgenden stets diese Verwendung findet.

Den größten Anteil am Leinöl stellt die Linolensäure (C<sub>18:3</sub>): Je nach Sorte kann sie über 50% des Leinöls ausmachen. Eine Eigenschaft der Linolensäure ist ihre hohe Oxidationsneigung: Dieses hat zur Folge, daß das Leinöl im Vergleich zu anderen

Pflanzenölen relativ schnell ranzig und so für die menschliche Ernährung unbrauchbar wird. Daher darf Leinöl, damit es zur Herstellung von Speiseöl verwendet werden kann, nicht mehr als 3% Linolensäure enthalten (THOMAS & VON BRUCK 1985). Andererseits benötigen einige chemische Anwendungen gerade besonders reduzierende („trockene“) Öle als Rohstoff (ROWLAND et al. 1995). Dieses Beispiel verdeutlicht die Notwendigkeit der Entwicklung von Leinsorten, welche über ein modifiziertes Fettsäuremuster verfügen.

Untersuchungen von Genbank-Material zeigten, daß die genetische Variation bezüglich des Fettsäuremusters innerhalb der klassischen Kultursorten relativ begrenzt ist (YERMANDOS & HELMSTREET 1965, GREEN & MARSHALL 1981). Die Einkreuzung anderer *Linum*-Wildarten zur Erweiterung des genetischen Potentials ist aufgrund der unterschiedlichen Chromosomenzahl und Inkompatibilitätsschranken nicht möglich (GREEN 1983). Die Technik der Protoplastenfusion wurde zwar für Lein etabliert (BARAKAT & COCKING 1985, LING & BINDING 1987), jedoch ist die Erfolgsrate dabei äußerst niedrig (NICHTERLEIN et al. 1988). Erfolgreich wurde dagegen die Induktion von Mutationen zur Entwicklung neuer Zuchtlinien angewendet.

**Tab. 2:** Mutationslinien der kanadischen Kultursorte McGregor (verändert nach ROWLAND et al. 1995).

Linie	Palmitinsäure <i>C</i> <sub>16:0</sub>	Stearinsäure <i>C</i> <sub>18:0</sub>	Ölsäure <i>C</i> <sub>18:1</sub>	Linolsäure <i>C</i> <sub>18:2</sub>	Linolensäure <i>C</i> <sub>18:3</sub>
<b>McGregor</b>	9,4%	5,1%	18,4%	14,6%	49,5%
<b>E1747</b>	9,5%	4,6%	15,6%	65,3%	2,1%
<b>E67</b>	27,8%	1,8%	17,5%	6,0%	42,0%
<b>E1929</b>	9,5%	3,4%	51,7%	16,3%	16,2%

Anfangs wurde zur Induktion von Mutationen Röntgenstrahlung verwendet. Auf diese Weise konnte die Sorte Redwood-65 entwickelt werden (LARTER et al. 1965). Diese Sorte weist in erster Linie einen gesteigerten Ölertrag auf. Seit den achtziger Jahren wird als mutagene Agens Ethylmethansulfonat (EMS) genutzt. Gleichzeitig wurde verstärkt auf spezielle Fettsäuremuster Wert gelegt. So wurden von der kanadischen Kultursorte McGregor mehrere Mutationslinien erzeugt (Tab. 2) (ROWLAND & BHATTY 1990).

Ähnliche Untersuchungen wurden auch mit den Sorten Bionda und Raulinus durchgeführt (NICHTERLEIN et al. 1988). Lediglich Mutationslinien der Sorte Raulinus erwie-

sen sich als stabil. Diese Mutationslinien wiesen im Vergleich zu der Ursprungsorte einen reduzierten Linolensäuregehalt auf (< 4,0% gegenüber 55%).

Die Entwicklung von Mutationslinien stellt eine stark zufallsorientierte und zeitaufwendige Methode dar, um neues Material zur Ölleinzüchtung zu entwickeln. Um eine zielgerichtetere und effektivere Züchtung zu ermöglichen, empfiehlt sich die Etablierung einer markergestützten Selektion (*marker assisted selection*, MAS). Dadurch kann eine zielgerichtete Auslese auf einzelne Merkmale, wie z.B. einzelne Fettsäure-Anteile, erfolgen.

Grundlage dafür ist die Kenntnis der Physiologie der Fettsäure-Biosynthese. Diese ist, im Unterschied zu ihrer genetischen Regulation, gut charakterisiert. Im folgenden soll sie kurz erläutert werden.

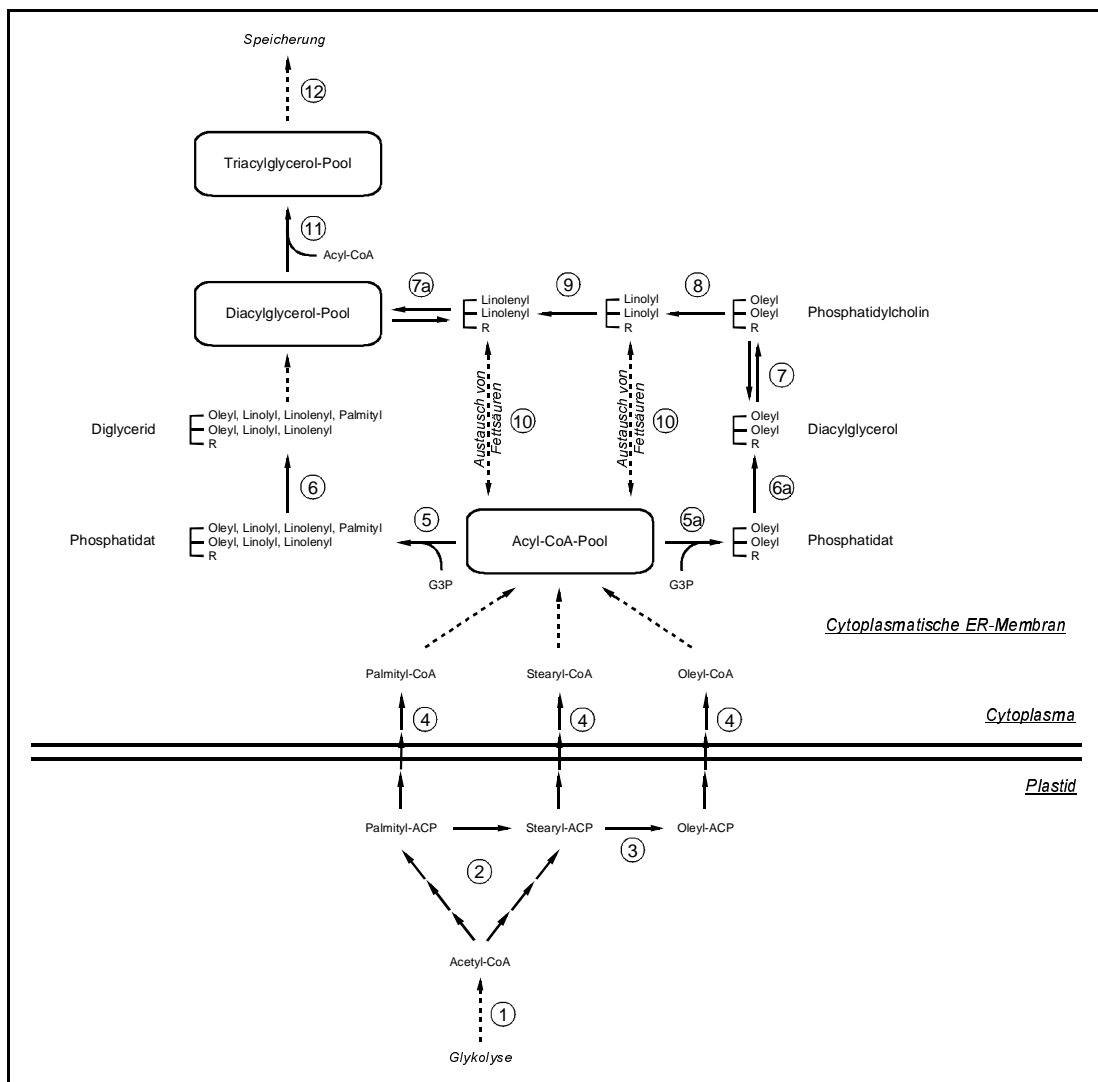
Den Hauptreservestoff des Leinsamens stellen die Neutralfette (Triacylglycerole) dar. Sie werden in speziellen Zellkompartimenten, den Oleosomen, gespeichert und stellen die wichtigste Energiequelle für den keimenden Samen dar. Für die wirtschaftliche Eignung des Leinöls sind die Kettenlänge sowie der Sättigungsgrad der Fettsäurereste der Triacylglycerole von Bedeutung.

Endprodukt der im Cytoplasma stattfindenden Glycolyse ist Pyruvat (Abb. 2, Schritt 1). Im Zuge der oxidativen Decarboxylierung entsteht aus Pyruvat Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA). Acetyl-CoA stellt einen Schlüsselpunkt des zellulären Energiestoffwechsels dar. Zur Gewinnung von ATP und Reduktionsäquivalenten kann Acetyl-CoA in die Mitochondrien transportiert werden, wo es im Zuge des Citratzyklus vollständig zu CO<sub>2</sub> oxidiert wird. In Zeiten ausreichender Energieversorgung kann Acetyl-CoA aber auch zur Bildung von Reservestoffen genutzt werden. Dazu wird Acetyl-CoA in die Chloroplasten transferiert, wo es zur Synthese von Fettsäuren dient.

Acetyl-CoA wird durch eine Acetyl-CoA-Carboxylase (ACCase) zu Malonyl-CoA carboxyliert (2). Diese Reaktion erfordert Energie, welche durch die gleichzeitige Hydrolyse von ATP zur Verfügung gestellt wird. Die eigentliche Synthese von langkettigen Fettsäuren (Acylierung) wird durch die Fettsäure-Synthase (FAS), einem Multienzymkomplex, katalysiert. Zunächst findet eine Übertragung von Acetyl- und Malonylresten von Coenzym A auf ein Acyl-Carrier-Protein (ACP) statt. Anschließend wird der Malonylrest von Malonyl-ACP auf den Acetylrest von Acetyl-ACP unter der Abspaltung von ACP übertragen. Dieser Schritt erfordert die parallele Oxidation von



NADH+H<sup>+</sup>. Das resultierende Acyl-ACP kann mehrmals durch weitere Malonylreste verlängert werden. Als Endprodukt dieser Acylierung entstehen die langkettigen Fettsäurederivate Palmityl-ACP und Stearyl-ACP. Eine detailliertere Darstellung der durch die FAS katalysierten Reaktionen findet sich in allgemeinen Lehrbüchern zur Biochemie (z.B. STRYER 1994). Stearyl-ACP kann durch eine weitere enzymatische Reaktion modifiziert werden. Die Stearyl-ACP-Desaturase fügt eine *cis*- $\Delta$ 9-Doppel-



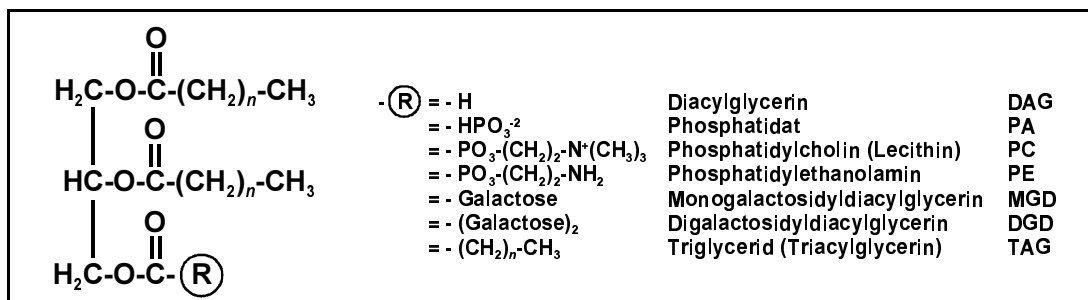
**Abb. 2:** Schematischer Ablauf der Triacylglycerolsynthese.

Durchgezogene Pfeile symbolisieren enzymatische Reaktionen; unterbrochene Pfeile symbolisieren Zusammenhänge. Ziffern weisen auf Erläuterungen im Text hin. Funktionelle Zusammenhänge mit in anderen Zellkompartimenten stattfindenden Stoffwechselprozessen werden durch kursive Schrift verdeutlicht.

Die genaue Strukturformel der einzelnen Zwischenprodukte findet sich in Abb. 3.

bindung in Stearyl-ACP ein (3). Es entsteht Oleyl-ACP mit einem ungesättigten Acylrest. Eine Acyl-ACP-Thioesterase katalysiert die Hydrolyse der Acyl-ACPs (4) zu den freien Fettsäuren Palmitinsäure (C<sub>16:0</sub>), Stearinsäure (C<sub>18:0</sub>) und Ölsäure (C<sub>18:1</sub>) mit 16 bzw. 18 Kohlenstoffatomen. Ölsäure und, in geringerem Umfang auch die Zwischenprodukte Stearinsäure und Palmitinsäure, können aus den Chloroplasten in das Cytosol diffundieren. Im Cytosol erfolgt durch eine Acyl-CoA-Synthetase die Kopplung der Fettsäuren an das Coenzym A.

Die Acyl-CoA-Komplexe werden zu dem glatten Endoplasmatischen Reticulum (ER) transferiert. An der cytosolischen Membran des ERs findet die Synthese von Di- und Triacylglycerolen (Übersicht in Abb. 3) aus dem Acyl-CoA-Pool sowie Glycerin-3-phosphat statt. Letzteres wird aus verschiedenen Zwischenprodukten der Glycolyse synthetisiert.



**Abb. 3:** Molekularstruktur der häufigsten pflanzlichen amphipathischen Lipide.

Eine Glycerin-3-phosphat-Acyltransferase synthetisiert aus zwei Acyl-CoA und einem Glycerin-3-phosphat Phosphatidat (Abb. 2, Schritt 5). Phosphatidat wiederum wird durch eine Phosphatid-Phosphatase dephosphoriliert; es entsteht ein Diacylglycerol. Durch eine Veresterung des Acylrestes eines Acyl-CoA mit einem Diacylglycerol wird ein Triacylglycerol (dt.: Triglycerin) synthetisiert (11). Diese Reaktion wird von der 1,2-Diacylglycerol-Acyltransferase katalysiert. Triacylglycerole stellen das Endprodukt der Lipidsynthese dar. Sie werden in subzellulären Organellen, den Oleosomen, gespeichert (12).

Im Zuge der Fettsäuresynthese entstehen nur drei Typen von Acyl-CoA: Palmityl-CoA, Stearyl-CoA und Oleyl-CoA. Ungesättigtere Acylreste werden erst im Zuge der Diacylsynthese erzeugt. Ausgangspunkt des „Kennedy-Biosyntheseweges“ (STYMNE & STOBART 1987) ist ein Diacylglycerol, welches an der sn-1 und sn-2 Position einen Oleyl-Rest trägt. Die Synthese dieses Diacylglycerols findet im Rahmen der allge-

meinen Diacylglycerolsynthese statt (5a und 6a). Das Diacylglycerol wird durch eine Cholin-Phosphotransferase zu Phosphatidylcholin (dt.: Lecithin) modifiziert (7). Danach können schrittweise die Acylreste des Phosphatidylcholins durch acylspezifische Desaturasen desaturiert werden (8 und 9). Es entstehen Linolyl- ( $C_{18:2}$ ) und Linolenylreste ( $C_{18:3}$ ). Acyl-Reste, welche sich an der mittleren, sn-2 Position befinden, können auf ein Coenzym A übertragen werden und so in den Acyl-CoA-Pool einfließen (10). Die direkte Umwandlung von 1,2-Dilinolyl-phosphatidylcholin zu 1,2-Dilinolylglycerol mittels der Cholin-Phosphotransferase ist ebenfalls möglich (7a).

Lipide stellen eine effektive Form der Energiespeicherung dar. Im Vergleich zu Kohlenhydraten besitzt der Kohlenstoff in den Lipiden eine höhere Reduktionsstufe. Die komplette Oxidation von 1 g Fett oder Öl setzt mit 9,3 kcal etwa dreimal soviel Energie frei wie die Oxidation von 1 g Stärke. Dadurch kann pro Gramm Speicherstoff eine wesentlich höhere Menge an ATP gebildet werden.

Die genetische Regulation des Fettsäure-Stoffwechsels, insbesondere die der Biosynthese der Reservestoffe, ist beim Kulturlein ebenso wie bei anderen Kulturpflanzen nur relativ wenig untersucht.

Die Desaturierung von Linolat zu Linolenat (Abb.2, Schritt 9) scheint in erster Linie von zwei unabhängig segregierenden Major-Genen, *Ln1* und *Ln2*, reguliert zu werden (GREEN 1986, NTIAMOAH et al. 1995). Beide Gene zeigen eine additive Wirkung und liegen in zwei dominant/rezessiven Allelen vor. Aufgrund von vergleichenden Analysen im Fettsäuregehalt des Samenöles von verschiedenen Kultursorten kann aber die Existenz weiterer Major-Gene in anderen Kultursorten nicht ausgeschlossen werden (GREEN 1986). Gleichfalls scheinen sich zudem eine Reihe von Minor-genen auf den Linolenatgehalt auszuwirken, von denen allerdings noch keines genau determiniert werden konnte (DAS & RHAH 1974).

Marker für diese Gene oder generell für den Linolensäuregehalt im Samenöl sind für den Kulturlein bisher nicht bekannt. Relativ gut untersucht ist dagegen die Regulation der Fettsäure-Synthese bei der Acker-Schmalwand (*Arabidopsis thaliana* L.). Es sind Mutationslinien bekannt, bei der die Desaturierung von Ölsäure zu Linolsäure (*fad2*) bzw. von Linolsäure zu Linolensäure (*fad3*) unterbrochen sind (BROWSE & SOMERVILLE 1991). Die *fad3*-Mutation konnte auf Chromosom 2 von *A. thaliana* kartiert werden, ein engekoppelter RFLP-Marker (ASA2) kartiert 0,4 cM entfernt (NIYOGI & FINK 1991). ARONDEL et al. konnten 1992 das *fad3*-Gen klonieren.

Bei der Rapspflanze (*Brassica napus* L.) wurden ebenfalls verschiedene Marker für den Linolensäuregehalt gefunden. HU et al. (1995) beschrieben einen kodominant segregierenden RFLP-Marker, welcher 26,5% der phänotypischen Variation erklärt. TANHUANPAA et al. (1995) fanden einen RAPD-Marker, welcher 23% der phänotypischen Variation erklärt und dominant für einen hohen Linolenatgehalt ist. THORMANN et al. (1996) berechnete anhand einer RFLP-Karte zwei QTLs, welche zusammen 60% der phänotypischen Variation beschrieben. Einer dieser QTLs lag in dem Bereich des *fad3*-Gens. Diese Ergebnisse konnten von JOURDREN et al. (1996) mittels einer RAPD-Analyse bestätigt werden, allerdings konnten die zwei QTLs in diesem Fall 71% der phänotypischen Varianz erklären. SOMERS et al. (1998) fanden dagegen drei ungekoppelte Loci, von denen einer im Bereich des *fad3*-Genes kartierte. Zusammen beschrieben diese QTLs 51% der phänotypischen Variation.

Über die Desaturierung von Ölsäure zu Linolsäure (Abb. 2: Schritt 8) liegen bislang keine genetischen Untersuchungen für den Lein vor. Analysen bei der Färberdistel *Carthamus tinctorius* L. (Saflor) zeigten, daß dieser Biosynthese-Schritt wahrscheinlich durch ein Major-Gen, *Ol*, reguliert wird. Bisher wurden ein dominantes Allel sowie zwei rezessive Allele für dieses Gen gefunden (KNOWLES & HILL 1964). Für den gleichen Synthese-Schritt wurde beim Mais (*Zea mays* L.) ebenfalls ein einziges Gen, *In*, postuliert (DE LA ROCHE et al. 1971). Bei *Arabidopsis thaliana* L. wurde eine Mutationslinie (*fad2*), bei der die Desaturierung der Fettsäuren an dieser Stelle unterbrochen ist, gefunden (BROWSE & SOMERVILLE 1991).

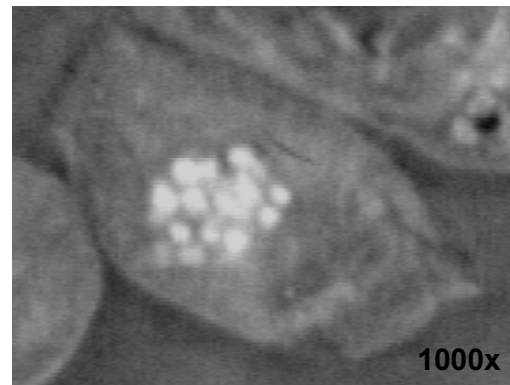
Die genetische Regulation der Fettsäure-Syntheseschritte, die in den Plastiden lokalisiert sind (Abb. 2: Schritte 2 und 3), ist ebenfalls nur wenig erforscht. Bei dem Kulturlein konnte anhand der Analyse der McGregor-Mutante E67 nachgewiesen werden, daß für die alternative Desaturierung von Palmitinsäure (C<sub>16:0</sub>) zu Palmitolensäure (C<sub>16:1</sub>) anstelle der Acetylierung zu Stearinsäure (C<sub>18:0</sub>) ein einzelnes Gen verantwortlich ist (NTIMOAH et al. 1995). Dieser Stoffwechselweg tritt bei den normalen Kultursorten des Leins allerdings nicht auf. Es konnte bestimmt werden, welches Enzym genau von der Mutation betroffen ist. Insgesamt ist nur bekannt, daß die Synthese des ACPs und der Stearyl-Desaturase (Abb. 2: Schritt 3) wahrscheinlich von fünf Genen gesteuert wird (OHLROGGE & JAWORSKI 1997).

Ebenso wie die Genetik der Fettsäurestoffwechsels ist die allgemeine Genetik des Kulturleins nur ansatzweise beschrieben. Innerhalb der Gattung *Linum* zeigt sich eine überaus hohe Variabilität des Karyotyps. Die Chromosomenzahlen variieren zwischen  $2n = 12$  und  $2n = 84$  (HOFFMANN et al. 1985, NICKEL 1993). Bei 70% aller Arten finden sich jedoch Chromosomenzahlen von  $2n = 18$  und  $2n = 30$  (RAY 1944). Der Kulturlein *Linum usitatissimum* subsp. *usitatissimum* besitzt  $2n = 30$  Chromosomen (Abb. 4), ebenso wie die Wildform *L. usitatissimum* subsp. *angustifolium*. Das gesamte Genom von *L. usitatissimum* ist relativ klein, es umfaßt  $7,0 \times 10^8$  bp / 1C (CULLIS 1981).

Als Besonderheit fällt auf, daß bei *L. usitatissimum* ein Nucleolenchromosom einen „Satelliten“ besitzt, d.h. einen größeren Chromosomenabschnitt, welcher über einen längeren euchromatischen Abschnitt mit dem „Haupt“-Chromosom verbunden ist. Bei ungünstigen Präparationstechniken kann dieses Chromosom leicht zerfallen und eine höhere Chromosomenzahl vortäuschen (MASIMA 1947, PIRSON 1955). *L. usitatissimum* gilt als sekundär polyploid. In dem postulierten Polyploidisierungsschritt

fand eine Verdopplung der Chromosomenzahl von  $n = 8$  auf  $n = 16$  statt. Dabei scheint es jedoch zu dem Verlust eines Nucleolenchromosomes gekommen zu sein. Gestützt wird diese Annahme durch Untersuchungen von PIRSON (1955): Zwischen Chromosomenpaaren existieren Homologiebeziehungen, welche häufig zu einer Sekundärpaarung von Bivalenten während einzelner Stadien der Meiose führen. Zudem ist bekannt, daß gerade Nucleolenchromosomen zu einer Multivalentbildung neigen, so daß leicht eine ungleichmäßige Verteilung der Chromosomen auf die Tochterzellen erfolgen kann.

Versuche zur künstlichen Polyploidisierung von Kulturlein wurden von verschiedenen Autoren beschrieben (Zusammenstellung s. HOFFMANN 1961). Im allgemeinen zeigten sich jedoch polyploidisierte Sorten ( $4n$ ) im Feldversuch den diploiden Ursprungsorten unterlegen und als weniger für den Anbau geeignet (LEVAN 1942). Ebenso



**Abb. 4:** Zelle aus der Wurzelspitze des Leins.

Die Metaphase-Chromosomen erscheinen durch eine Feulgenfärbung als helle Punkte.

weisen polyploidisierte Sorten einen deutlich geringeren Ertrag auf: Bei tetraploiden Faserleinen fällt sowohl der Fasergehalt als auch die Faserqualität schlechter aus als bei diploiden Faserleinen (HOFFMANN 1961). Tetraploide Ölleine besitzen einen deutlich niedrigeren Ölgehalt (HOFFMANN 1961, YERMANDOS und GILL 1967). Die Polyploidisierungstechnik scheint daher über kein wirtschaftlich nutzbares Potential für die Leinzüchtung zu verfügen.

## 1.2 Genetische Marker

Grundlage der Charakterisierung sowohl von Individuen als auch von Verwandtschaftsgruppen ist die Verfügbarkeit einer beschreibenden Methode. In der Biologie hat sich dafür das System der genetischen Marker etabliert.

Prinzipiell stellt ein genetischer Marker eine Varianz homologer DNA-Loci dar, d.h. ein solcher DNA-Locus liegt in Form von unterschiedlichen Allelen vor. Die Allele brauchen nicht zwingend kodierend sein, sie müssen lediglich stabil vererbbar sein. Im direkten Vergleich zweier homozygoter Individuen äußert sich das Vorliegen von verschiedenen Allelen als Polymorphismus. Ein idealer genetischer Marker sollte mehreren Kriterien genügen: Er sollte keine Umweltvarianz zeigen und eine möglichst hohe Heritabilität besitzen. Er sollte in allen Phasen der Individualentwicklung (Ontogenese) vorhanden sein. Seine Vererbbarkeit sollte kodominant sein. Marker dieses Typs sollten statistisch gleichmäßig über das gesamte Genom verteilt sein. Eine Übertragung sollte auch bei weniger eng verwandten Organismen (z.B. Arten) möglich sein. Die Entwicklung solcher Marker sollte einen möglichst geringen Kosten- und Arbeitsaufwand erfordern, ebenso wie die Anwendung dieser Marker.

Als Marker kommen sowohl vollständig ausgeprägte Eigenschaften, entweder morphologischer oder biochemischer Natur, als auch Unterschiede auf molekularer Ebene, d.h. im Genom, in Frage. Es werden dementsprechend morphologische Marker, biochemische Marker und molekulare Marker unterschieden.

### 1.2.1 Morphologische Marker

Spezifische Unterschiede in der Morphologie von Organismen, wie z.B. Farbe und Form einzelner Organe, können als Marker dienen. Dazu müssen diese Eigenschaften jedoch eindeutig bestimmbar und monogenen Ursprungs sein. Das klassische Beispiel für die Anwendung phänotypische Marker stellen die Kreuzungsexperimente von MENDEL (1866) dar, welche die Grundlage nicht nur der modernen Genetik sondern auch der wissenschaftlichen Pflanzenzüchtung bildeten. MENDEL untersuchte bei der Erbse mehrere phänotypische Merkmale, u.a. Blütenfarbe, Blütenstellung, Form und Farbe der Samen und Hülsen sowie die Stengellänge.

Morphologische Marker bilden noch heute die Grundlage der systematischen Biologie, anhand derer die taxonomische Einordnung von Organismen erfolgt. Gleichfalls können anhand morphologischer Marker Aussagen über evolutionäre Prozesse getroffen werden. So konnten DIDERICHSEN & HAMMER (1994) anhand einer Analyse von

verschiedenen morphologischen Merkmalen eine Aussage über die Verwandtschaft des Kulturleins (*L. usitatissimum* L. subsp. *usitatissimum*) zu dem schmalblättrigen Flachs (*L. usitatissimum* L. subsp. *angustifolium* (Huds.) Thell.) treffen. Insgesamt untersuchten sie 63 Akzessionen der Subspezies *usitatissimum* sowie 73 Akzessionen der Subspezies *angustifolium*. Für Subspezies *usitatissimum* beobachteten sie 17 morphologische Parameter, für Subspezies *angustifolium* 29. Im Vergleich zu anderen Kulturpflanzen besitzt der Lein nur relativ wenig variable phänotypische Eigenschaften. So sind für die Gerste über 120 morphologische Marker bekannt und kartiert (SCHÖNFELD 1998).

Jedoch ist die Verwendbarkeit von morphologischen Markern zur Analyse der genetischen Diversität nicht unumstritten, da sie unter Umständen durch Umwelteinflüsse modifiziert werden können (SMITH & SMITH 1989). Durch pleiotrope Wirkungen mancher Gene können die realen Geneinflüsse verschleiert werden (HOFFMANN 1961). Zudem sind Befunde, welche anhand morphologischer Merkmale ermittelt wurden, nicht immer mit anderen Analysemethoden zu reproduzieren (CROSS 1992).

Nur selten sind morphologische Marker mit wirtschaftlich wichtigen Merkmalen korreliert und damit in der Pflanzenzüchtung anwendbar. Für den Lein ist die Samenfarbe und ihre Korrelation zu agronomischen Größen relativ gut untersucht, daher soll an dieser Stelle kurz auf die der Ausprägung der Samenfarbe zugrundeliegende Genetik eingegangen werden.

Der Samen weist nicht nur innerhalb der Gattung *Linum* sondern auch innerhalb der Art *L. usitatissimum* eine große Variabilität auf. Daher rückten diese Merkmale neben der Blütenmorphologie schon früh ins Zentrum der Aufmerksamkeit der klassischen Genetiker. Die Samenfarbe ergibt sich aus der Fähigkeit der Pflanzen Pigmente in ihre Samenschale einzulagern (RÜDIGER 1942). Die Samenschale selbst besteht aus fünf Schichten, wobei nur die mittleren Schichten das Aussehen des Samens prägen (BOESEWINKEL 1980). In Abwesenheit von Pigmenten ist die Samenschale durchsichtig und der Same erscheint aufgrund der Färbung der Kotyledonen gelb. Mit einer gefärbten Samenschale nimmt der Same hell- bis schwarzbraune Farbtöne an. THAMMES (1930) führte dieses auf das Vorliegen eines dominanten „Grundfaktors“ G zurück. Liegt dagegen das rezessive Allel g homozygot vor, ist der Same stets gelb. Desweiteren findet eine Interaktion mit verschiedenen Genen, welche in erster Linie die Morphologie der Reproduktionsorgane beeinflussen, statt. Die unterschiedliche



Ausprägung des Phänotyps in Abhängigkeit der Genkombinationen ist in Tabelle 3 dargestellt. Als Wildtyp wird braun angenommen (SAEDI & ROWLAND 1997), allerdings findet man bei der wahrscheinlichen Wildform *L. usitatissimum* subsp. *angustifolium* weder braunen noch gelben Samen, sondern nur verschiedene gelb-braun bzw. olive Tönungen des Samens (DIEDERICHSEN & HAMMER 1995).

**Tab. 3:** Ausprägung des Phänotyps in Abhängigkeit von verschiedenen Genkombinationen (verändert nach THAMMES 1930).

Geneexpression	Petalen		Samenfarbe	
	Farbe	Form	Allel <i>G</i>	Allel <i>g</i> (homozygot)
<u>B</u> <sub>1</sub> <u>B</u> <sub>2</sub> <u>C</u> <u>D</u> <u>E</u>	blau	flach	braun	gelb
<u>B</u> <sub>1</sub> <u>B</u> <sub>2</sub> <u>C</u> <u>D</u> <u>f</u>	lila	flach	braun	gelb
<u>B</u> <sub>1</sub> <u>B</u> <sub>2</sub> <u>C</u> <u>d</u> <u>E</u>	rosa	flach	gelbbraun bis schwarz	gelb
<u>B</u> <sub>1</sub> <u>B</u> <sub>2</sub> <u>C</u> <u>d</u> <u>f</u>	weiß	flach	gelbbraun bis schwarz	gelb
<u>B</u> <sub>1</sub> <u>B</u> <sub>2</sub> <u>c</u> <u>D</u> <u>E</u>	weiß	flach	braun	gelb
<u>B</u> <sub>1</sub> <u>B</u> <sub>2</sub> <u>c</u> <u>d</u> <u>E</u>	weiß	flach	gelbbraun bis schwarz	gelb
<u>b</u> <sub>1</sub> <u>B</u> <sub>2</sub> <u>C</u> <u>D</u> <u>E</u>	weiß	gekräuselt	graugrün	gelb
<u>b</u> <sub>1</sub> <u>B</u> <sub>2</sub> <u>C</u> <u>d</u> <u>E</u>	weiß	flach	graugrün bis schwarz	gelb
<u>B</u> <sub>1</sub> <u>b</u> <sub>2</sub> <u>C</u> <u>d</u> <u>E</u>	weiß	gekräuselt	braun	gelb
alle weiteren Kombinationen mit homozygotem Allel <u>b</u> <sub>2</sub>	weiß	k.A.	k.A.	k.A.

Es handelt sich stets um dominant/rezessive Effekte, d.h. für die Ausprägung eines rezessiven Merkmales müssen stets beide Allele in rezessiver Form vorliegen (aa), während bei der Ausprägung eines dominanten Merkmales verschiedene Allelkombinationen möglich sind (AA oder Aa).

k.A. = Es liegen keine Angaben vor.

Die Gen-Nomenklatur nach THAMMES wird in Europa sowie den USA und Canada angewandt (BEARD & COMSTOCK 1965). Die neuere, modifizierte Nomenklatur der Gene ist in Tabelle 4 wiedergegeben. Ein alternatives Modell nach SHAW et al. (1931) postuliert 3 unterschiedliche Gene Gg, Mm und Xx, die zusammen mit einem Gen Dd, welches die Blütenfarbe reguliert, eine differenzierte Samenfarbe bewirken. Jedoch sind diese Gene bislang nur in indischen Sorten nachgewiesen worden.

PLONKA hat 1951 zwei Sorten (Stormont Motley und Safi line 2) beschrieben, deren Samen hell gefleckt sind. Diese Scheckung ist wahrscheinlich durch einen weiteren rezessiven Faktor bedingt, der sich allerdings nur in Abwesenheit von D ausprägt. In jüngerer Zeit (1997) beschreiben SAEIDI & ROWLAND ebenfalls Lein-Linien mit geflecktem Samen, die durch Kreuzung aus verschiedenen, durch EMS-Behandlung induzierte McGregor-Mutanten  $\{(E1747 \times E1929) \times (E67 \times E1747)\} \times E1306$  entstanden sind. Auch die „künstlich“ induzierte Scheckung ist ein rezessives Merkmal.

**Tab. 4:** Neuere Nomenklatur der Gene, welche neben der Ausprägung der Blütenfarbe auch die Samenfarbe beeinflussen.

Symbol	Genwirkung
<u>B</u> <sub>1</sub> <u>b</u> <sub>1</sub>	<u>B</u> <sub>1</sub> : erlaubt Färbung der Petalen <u>b</u> <sub>1</sub> : Petale sind stets weiß gefärbt
<u>B</u> <sub>2</sub> <u>b</u> <sub>2</sub>	<u>B</u> <sub>2</sub> : erlaubt Färbung der Petalen <u>b</u> <sub>2</sub> : Petale sind stets weiß gefärbt
<u>C</u> <u>c</u>	<u>C</u> : erlaubt Färbung der Petalen <u>c</u> : Petale sind weiß gefärbt
<u>D</u> <u>d</u>	<u>D</u> : Petalenfarbe ist blau <u>d</u> : Petalenfarbe ist blau
<u>F</u> <u>f</u>	<u>F</u> : Intensiviert Petalenfarbe <u>f</u> : Ändert Petalenfarbe von blau nach lila
<u>G</u> <u>g</u>	<u>G</u> : Samenfarbe gefärbt <u>g</u> : Samenfarbe ungefärbt

Verändert nach BEARD & COMSTOCK 1965.

COMSTOCK & KOMMEDAHL (1956) fanden eine positive Korrelation zwischen gelber (beiger) Samenfarbe und Tausendkorngewicht (Abk.: TKG), Ölgehalt, Jodzahl aber auch dem prozentualen Anteil an geschädigtem Samen aufgrund der mit der hellen Samenfarbe einhergehenden dünneren Samenschale. Negativ korreliert war die gelbe Samenfarbe dagegen mit der Keimfähigkeit, dem Samenertrag und dem Samengewicht. Diese Ergebnisse konnten von CULBERTSON et al. 1960 bestätigt werden. Ferner ist das Samengewicht positiv korreliert mit der Länge und Breite der Kronblätter und der Samenkapsel (DIEDERICHSEN & HAMMER 1994). Eine Korrelation der (seltenen) gelben Blütenfarbe mit dem Gehalt an Linolensäure stellte PLESSERS (1966) fest.

Gleichfalls problematisch ist die Erstellung einer Kopplungskarte ausschließlich anhand phänotypischer Marker. Nach den ersten Kreuzungsversuchen von MENDEL (1865) war die Erbse eine der Modellpflanzen der Genetik. Mittlerweile konnten 137 Loci für phänotypische Merkmale lokalisiert werden (s. Internet-Homepage: <http://hermes.bionet.nsc.ru/peamap/>). Es ist jedoch nicht möglich, anhand dieser Daten eine durchgängige Kopplungskarte für das Erbsengenom zu erstellen. Nur für vier

der sieben Chromosomen liegt eine ununterbrochene Kopplungskarte vor. Die anderen Chromosomen sind nur partiell charakterisiert.

### 1.2.2 Marker auf physiologischer Ebene

Neben morphologischen Merkmalen lassen sich auch Eigenschaften auf physiologischer Ebene zur Analyse bestimmter genetischer Fragestellungen nutzen. So weist der pflanzliche Sekundärstoffwechsel eine hohe Variation an Metaboliten auf. Mehr als 20.000 sekundäre Pflanzenstoffe sind wissenschaftlich beschrieben (STRAßBURGER et al. 1991). Während der pflanzliche Primärstoffwechsel zur Aufrechterhaltung essentieller Lebensvorgänge dient, produziert der Sekundärstoffwechsel Stoffe, welche eine Interaktion mit der Umwelt bewirken („ökologisch wirksame Pflanzenstoffe“). Die sekundären Pflanzenstoffe lassen sich in drei Klassen einteilen: die der Terpene, welche in erster Linie als Gift- oder Bitterstoffe gegen Fraßfeinde in Pflanzenorgane eingelagert werden, die Klasse der stickstoffhaltigen Sekundärstoffe, die in erster Linie die Alkaloide umfaßt, und die Klasse der phenolischen Stoffe, zu der sowohl Schutz- als auch Lockstoffe zählen. Zu letzteren zählen auch die Flavonoide, welche hauptsächlich als Pigmente in Blüten, Blättern und Früchten eingelagert werden. In diesem Fall wären dann die Grenzen zu den morphologischen Markern fließend.

Die Kenntnisse über die Bildung sekundärer Pflanzenstoffe finden in erster Linie Anwendung bei der taxonomischen Klassifizierung von Pflanzenarten. Als Grundlage zur Erstellung von Variabilitätsstudien werden sie heute jedoch nicht mehr genutzt (BRETTEING & WIDRLECHNER 1995). Vorteile einer Nutzung der Sekundärmetabolite als Marker sind ihre hohe Heritabilität und ihre Stabilität (*qualitativ, jedoch nicht quantitativ*) gegenüber Umwelteinflüssen. Jedoch bleibt ihre Ausprägung meistens auf einzelne Pflanzenorgane oder -gewebe beschränkt. Auch kann ihre Synthese unter Umständen nur zu bestimmten Zeiten stattfinden. Zudem werden Modifikationen dieser Biosynthese-Wege nur selten von einzelnen Genen reguliert. Analysen dieser Stoffe sind häufig langwierig und nicht für eine Anwendung im großen Maßstab geeignet.

Eine Kopplung zwischen der Biosynthese pflanzlicher Sekundärstoffe und züchterisch wichtigen Merkmalen wird nur selten gefunden. Für den Kulturlein wurde die Analyse der Substituenten des Cutins sowie der Wachse als Marker für die Faserqualität vorgeschlagen (MORRISON III et al. 1999). Diese zählen zwar nicht direkt zu

den sekundären Pflanzenstoffen, sind von der Komplexität ihrer Synthese und ihrer biologischen Funktion aber durchaus mit diesen vergleichbar.

Der Fettsäurestoffwechsel stellt eine entscheidene Größe im Primärstoffwechsel nicht nur des Kulturleins sondern der gesamten Gattung *Linum* dar, wo er in erster Linie zum Aufbau von Reservestoffen dient (s.o.). Allerdings läßt sich innerhalb der Gattung *Linum* eine hohe Variabilität im Fettsäuremuster des Samenöls feststellen (PLESSERS 1966, YERMANDOS 1966, YERMANDOS et al. 1966). ROGERS (1972) verwendete die Anteile der einzelnen Fettsäuren, hierbei in erster Linie die der Linolen- und der Ölsäure, als Marker für eine entsprechende taxonomische Klassifizierung der *Linum*-Arten.

Wichtigere Marker auf physiologischer Ebene stellen die biochemischen Marker dar, welche Unterschiede in der Proteinstruktur, entweder bei Speicherproteinen oder Isoenzymen, detektieren. Im Gegensatz zu morphologischen Markern beruhen biochemische Marker in erster Linie direkt und unmittelbar auf den Translationsprodukten der Genloci, wobei diese natürlich ebenfalls, unter Umständen auch erheblichen, Modifikationen unterliegen können.

Zu den Speicherproteinen zählen die Albumine, die Globuline, die Prolamine und die Gluteline. Zu letzteren zählen die Hordeine, anhand derer phylogenetische Untersuchungen innerhalb der Gattung *Hordeum* durchgeführt wurden (DOLL & BROWN 1979, ASFAW 1989). Hordein-Markerloci konnten ebenfalls erfolgreich in Kopplungskarten der Gerste eingefügt werden (LINDE-LAURSEN et al. 1982, DOLL & JENSEN 1986). Auch bei anderen Poaceen, wie z.B. dem Weizen, konnte anhand der Analyse charakteristischer Speichergluteline erfolgreich eine taxonomische Klassifizierung durchgeführt werden (TAHIR et al. 1996). Eine eindeutige und vollständige Sortendifferenzierung ist jedoch aufgrund der limitierten Verfügbarkeit dieser Marker selten möglich (HSAM et al. 1993). „Speicherprotein-Marker“ verhalten sich analog zu einem Genlocus/Allel-Modell mit codominanter Vererbung und folgen den Mendelschen Regeln.

Ebenfalls auf Unterschieden in der Molekularstruktur beruhen die Isoenzym-Marker. Enzyme können bei gleicher katalytischer Funktion dennoch unterschiedliche Konformationen besitzen. Sind diese multiplen Enzymformen auf Unterschiede in der Primärstruktur, also der Aminosäuresequenz, zurückzuführen und diese wiederum auf eine Modifikation einzelner Gene, so liegen nach der Definition von MARKERT &

MÖLLER (1959) Isoenzyme vor. Isoenzyme besitzen neben ihrem codominanten Verhalten, ihrem relativ hohen Polymorphiegrad und ihrer Vererbarkeit nach den Mendelschen Regeln den entscheidenden Vorteil, daß sie stets in allen Geweben der Pflanze vorkommen und mittels relativ einfacher Methoden analysierbar sind (z.B. via Zymogramm-Technik (HUNTER & MARKERT 1957)). In der Pflanzengenetik wurden sie erstmals 1969 zur Sortendifferenzierung bei der Gerste eingesetzt (FRYDENBERG et al.). Bis heute wurden sie sowohl für eine Reihe populationsgenetischer Untersuchungen als auch für Genomkartierungen verwendet. Es konnten diverse Kopplungen zwischen Isoenzymen und wirtschaftlich wichtigen Genloci festgestellt werden, wie z.B. zu dem Nematodenresistenzgen (*Mi*) bei der Tomate (TANKSLEY & RICK 1980).

Für den Kulturlein konnten mehrere Enzyme gefunden werden, die in multiplen Formen auftreten. Es handelt sich dabei um verschiedene Esterasen und Peroxidasen (MARECK et al. 1995, YURENKOVA et al. 1995, DJIANA et al. 1996). Phylogenetische Untersuchungen oder Genomkartierungen mittels Isoenzymen wurden bislang nicht veröffentlicht.

Marker auf physiologischer Ebene stellen nützliche Mittel zur Sorten- und Artendifferenzierung dar, was sie für taxonomische und phylogenetische Analyse prädestiniert. Desweiteren konnten physiologische Marker in Nähe züchterisch wichtiger Gene gefunden werden. Allerdings ist die Anzahl der zur Verfügung stehenden Marker dieser Klasse begrenzt.

### **1.2.3 Molekulare Marker**

#### **1.2.3.1 RFLP-Marker**

Bestimmte Enzyme, die Restriktionsendonucleasen, erzeugen Brüche in doppelsträngiger DNA an für das jeweilige Enzym spezifischen Stellen (Restriktion) (GRODZICKER et al. 1974). Mittels dieser Restriktionsendonucleasen läßt sich das gesamte Genom von Organismen in kleinere Fragmente zerteilen. Es entstehen Fragmente unterschiedlicher Größe, je nachdem, wie häufig und an welcher Stelle im Genom die spezifische Erkennungssequenz vorliegt. Aufgrund von Mutationen können jedoch Sequenzen im Genom dergestalt verändert werden, daß eine Erkennungssequenz nicht mehr vorliegt. Anstelle zweier Fragmente wird dann in einer Restriktion nur noch eines erzeugt. Genauso ist es möglich, daß Erkennungssequenzen

durch Mutationen neu entstehen, so daß weitere Fragmente erzeugt werden. Im direkten Vergleich der Anzahl bzw. der Größe der Restriktionsfragmente lassen sich Organismen unterscheiden (GRODZICKER et al. 1974).

SOUTHERN entwickelte 1975 eine noch heute verwendete Technik zum Nachweis dieser Polymorphismen: Zuerst wird die genomische DNA restringiert und die erzeugten Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt. Als Restriktionsendonucleasen werden ausschließlich Enzyme der Klasse II eingesetzt (WINNACKER 1989). Anschließend werden die Restriktionsfragmente auf eine Trägermembran aus Nitrocellulose übertragen und auf dieser fixiert (*Southern-Blotting*). In diesem Zustand lassen sich einzelne Fragmente durch radioaktiv-markierte Einzelstränge komplementärer DNA, den sog. Sonden, detektieren (*Southern-Hybridisierung*). Man erhält Muster diskreter Fragment-Banden, je nach eingesetzter Sonde und eingesetztem Restriktionsenzym. Weisen zwei Individuen einen Unterschied in einzelnen Fragment-Banden auf, so liegt ein Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (Abk.: RFLP) vor.

RFLP-Marker stellen einen Idealtyp molekularer Marker dar. Sie sind codominant und werden stabil vererbt (EVOLA et al. 1986). Umwelteinflüsse treten bei RFLP-Markern nicht auf. Auch sind sie über das gesamte Genom gleichmäßig verteilt. Dadurch kann eine hohe Abdeckung des Genoms erzielt werden (BERNATZKY & TANKSLEY 1986). Liegen Informationen über die Lokalisierung eines RFLP-Markers im Genom vor, ist mithilfe dieses RFLP-Markers eine Zuordnung von anderen gekoppelten Markern zu einzelnen Chromosomen zuverlässig möglich. Ebenso lassen sich RFLP-Marker zur Berechnung von Konsensuskarten aus mehreren einzelnen Kopplungskarten nutzen (BÖRNER & KORZUN 1998, CHO et al. 1998). Die RFLP-Technik weist jedoch einen entschiedenen Nachteil auf: Diese Technik ist nicht automatisierbar, so daß eine Anwendung in größerem Maßstab mit sehr hohem Arbeits- und Zeitaufwand verbunden ist (BECKMANN & SOLLER 1983, BUNCE et al. 1986). Ein weiterer Nachteil der RFLP-Technik ist darin zu sehen, daß nur relativ wenige Polymorphismen (durchschnittlich 2-3) pro Einzelreaktion erfaßt werden (HATZ 1997). Neuere markergestützte Analysen verwenden daher RFLPs nur noch in geringem Umfang, hauptsächlich zur Lokalisierung von bekannten Genen (z.B. SPIELMEYER et al. 1998 b). Eine Übersicht über die anhand von RFLP-Markern erstellten genetischen Karten findet sich bei O'BRIEN (1993). Für manche Pflanzenarten konnten Kopplungskarten erstellt werden, welche über 1.000 RFLP-Loci umfassen (Tomate: TANKSLEY et al. 1992; Weizen: GALE et al. 1995; Reis: KURATA et al. 1994).

### 1.2.3.2 RAPD-Marker

Eine der bedeutendsten Entdeckungen auf dem Gebiet der Genomanalyse stellt die Entwicklung einer Methode zur selektiven Replikation von DNA *in vitro* dar. 1987 stellten MULLIS & FALLOONA das Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (engl.: *polymerase chain reaction*, Abk.: PCR) vor. Dabei wird DNA enzymatisch durch eine DNA-Polymerase beliebig oft dupliziert. Die Reaktion läuft in mehreren Einzelschritten ab: Zuerst wird der DNA-Doppelstrang (*Template*) denaturiert, d.h. linearisiert und in Einzelstränge getrennt. Die DNA-Polymerase ergänzt diesen Einzelstrang wieder zu einem Doppelstrang (*Amplifikation*). Startpunkt dieser Replikation muß ein Abschnitt doppelsträngiger DNA sein. Dieser wird durch die spontane Bindung von zu der DNA-Sequenz komplementären Oligonucleotiden (*Primer*) an den DNA-Einzelstrang erreicht. Durch das gezielte Design dieser Primer können DNA-Abschnitte selektiv vermehrt werden. Die Verwendung hitzestabiler DNA-Polymerasen, wie z.B. der *Taq*-Polymerase aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus*, ermöglicht bis zu 40 solcher Einzelreaktionen hintereinander, wobei die in der vorherigen Reaktion amplifizierte DNA jedesmal als *Template* für die nachfolgende Reaktion dient. Die Vermehrung der DNA erfolgt dadurch exponentiell.

Die Entwicklung der PCR-Technik führte zu einer Generation neuer Marker-Techniken, zu denen die RAPD-Technik (*random amplified polymorphic DNA*) (WILLIAMS et al. 1993), die DAF-Technik (*DNA amplification fingerprinting*) (CAETANO-ANOLLES et al. 1991) sowie die AP-PCR (*arbitrary primer-PCR*) (WELSH & MCCLELLAND 1990) zählen. Allen gemeinsam ist, daß mittels ein bis zwei Primern mit zufälliger Basensequenz anonyme Amplifikationsprodukte erzeugt werden, anhand derer polymorphe Genbereiche detektiert werden können. Polymorphismen entstehen dabei aufgrund von Punktmutationen innerhalb der Primerbindungsstellen oder durch chromosomale Umstrukturierungen, durch die die Länge der Amplifikationsprodukte variiert werden kann.

Von diesen PCR-gestützten Marker-Techniken fand die RAPD-Technik die weiteste Verbreitung. Dazu wird die unverdaute, genomische DNA mittels zufälliger Oligonucleotid-Primer in einer PCR amplifiziert. Die Primer sind 9, häufiger jedoch 10 Basen lang, besitzen einen GC-Gehalt von 50 bis 80 Prozent und müssen frei von Palindromen sein. Die so erzeugten Fragmente können auf einem einfachen Agarosegel aufgetrennt werden. Je nach verwendetem Primer werden zwischen 2 und 12

(seltener bis 20) Fragmente zwischen 300 und 3.000 bp erzeugt. Die erzeugten Polymorphismen detektieren jedoch ausschließlich dominant/rezessiv vererbte Loci.

RAPD-Marker besitzen im Vergleich zu anderen Marker-Techniken wie z.B. RFLPs eine Reihe von Vorteilen. Zum einen ist der Materialaufwand sehr gering. Zum anderen lassen sich relativ viele Einzelreaktionen in kurzer Zeit durchführen. Eine aufwendige Sonderausstattung (z.B. Isotopenlabor) ist nicht erforderlich. Zusammenfassend stellt die RAPD-Technik eine schnelle und sehr preiswerte Methode zur Genomanalyse dar. Ein Nachteil von RAPDs liegt allerdings in ihrer Abhängigkeit von der Konzentration der eingesetzten DNA und den PCR-Bedingungen. Eine konstante und vergleichbare Reaktion läßt sich nur durch eine Standardisierung der Reaktionsbedingungen erreichen (PAMMI et al. 1994).

#### 1.2.3.3 Marker auf der Basis repetitiver DNA

In den nichtcodierenden Abschnitten aller Genome kommen relativ häufig DNA-Abschnitte mit sich wiederholenden Sequenzmustern, sog. repetitive Sequenzen, vor. Es sind drei Typen von repetitiven Elementen bekannt. LINEs (*long interspersed repetitive elements*) mit Längen zwischen 6.000-7.000 bp, SINEs (*short interspersed repetitive elements*), Abschnitten von 100-500 bp ähnlicher Sequenzen. (Nicht zu verwechseln mit den long/short interspersed nuclear elements, deren Abkürzung ebenfalls LINE bzw. SINE lautet, welche aber bestimmte Klassen von transposablen Elementen darstellen (vgl. Capy et al. 1998).) Noch kürzere Sequenzwiederholungen werden als Satelliten-DNA (auch *short-sequence repeat*, Abk.: SSR) bezeichnet. Letztere bestehen aus 10-50 Kopien (*Repeats*) kürzerer DNA-Sequenzen und werden je nach Länge der wiederholten Sequenzen nach Mini- (11-64 bp umfassende Repeats) bzw. Mikrosatelliten (2-4 bp umfassende Repeats) unterschieden. Satelliten-DNA stabilisiert u.a. die Chromosomenstruktur in den Centromer-Bereichen und spielt eine wichtige Rolle in der Replikation von Chromosomen (Telomer-DNA).

Bei Mini- und Mikrosatelliten kommt es häufig zu einer Variation der Anzahl der Repeats selbst zwischen relativ engverwandten Organismen. Die nicht-repetitiven Randsequenzen der Satelliten-DNA sind hochkonservativ und können als Template für spezifische PCR-Primern genutzt werden. Via PCR kann so die Länge der Satelliten-DNA detektiert werden. Minisatelliten wurden erstmals von JEFFREYS et al. 1985 zur Erzeugung individueller Bandenmuster (*Fingerprints*) beim Menschen genutzt.



ROGSTAD et al. (1988) setzten diese Methode erstmals zur Analyse von pflanzlichen Genomen ein. Sie wiesen damit Minisatelliten bei der Gerste nach.

Die wesentlich einfacher aufgebauten Mikrosatelliten wurden zuerst von HAMADA et al. 1982 beschrieben. CONDIT & HUBBELL (1991) dokumentierten das Vorhandensein von Mikrosatelliten in pflanzlichen Genomen durch die Analyse von tropischen Baumarten und Mais.

Eine weitere Methode, welche die Verteilung und die unterschiedliche Länge von Mikrosatelliten-DNA nutzt, ist die ISSR-Technik (*inter-simple-sequence-repeat*). Sie wurde 1994 parallel von GUPTA et al. und ZIETKIEWICZ et al. entwickelt. Als Primer-template dienen hierbei jedoch nicht die nicht-repetitiven Randbereiche der Mikrosatelliten, sondern mehrere Repeats sowie eine zusätzliche variable Base, abweichend vom Wiederholungsmuster, am 3'-Ende. Letztere wirkt quasi als „Anker“ in der Randsequenz. Eine Amplifikation findet daher stets von den Enden eines Mikrosatelliten her statt. Somit wird die Amplifikation des kompletten Mikrosatelliten sichergestellt. Je nach Länge der entsprechenden repetitiven Sequenz werden dabei unterschiedlich große Fragmente erzeugt. Diese Methode ähnelt stark der RAPD-Technik. Der Vorteil von ISSRs gegenüber RAPDs liegt darin, daß aufgrund der zu erwartenden Größe der Mikrosatelliten die Primer doppelt so lang sein können (19-20 bp) und damit aufgrund einer höheren Annealing-Temperatur eine stringenterere und damit eine zuverlässigere PCR ermöglichen. Andererseits zeichnen sich ISSRs durch alle Vorteile der SSRs aus, sind aber in Entwicklung und Anwendung weit weniger aufwendig. Eine Einschränkung der ISSR-Technik liegt darin, daß, wie bei der RAPD-Technik auch, nur dominant/rezessiv vererbte Loci detektiert werden können.

ISSR-Marker wurden bereits für alle Bereiche der Genomanalyse verwendet. In der Unterscheidung von Sortenmaterial via Fingerprinting erwies sich die ISSR-Technik im Vergleich mit RAPDs, RFLPs und Isoenzymen als effektiveres Markersystem (TSUMURA et al. 1996, FANG et al. 1997, FANG & ROOSE 1997, PREVOST & WILKINSON 1999). Gegenüber Isoenzymen und RAPDs zeichnet sich die ISSR-Technik durch einen höheren Informationsgehalt aus (NAGAOKA & OGIHARA 1997). Im Vergleich zu RFLPs sind ISSR-Marker mit wesentlich geringerem Arbeits- und Materialaufwand verbunden.

ISSR-Marker wurden ebenfalls erfolgreich zur Kartierung von Resistenzgenen eingesetzt. RATNAPARKHE et al. (1998 a, b) gelang die Kartierung mehrerer ISSR-Marker, welche enggekoppelt mit den Resistenzgenen gegen Fusarium-Welke Rasse 1 und 4 bei *Cicer arietinum* L. waren. Sowohl bei monocotylen (Weizen: NAGAOKA & OGIHARA 1997) als auch bei dicotylen Species (z.B. Kartoffel: PREVOST & WILKINSON 1999) wurden ISSR-Marker verwendet. Auch bei Objekten, welche sich bei einer markergestützten Genomanalyse als problematisch erwiesen haben, wie z.B. Megagametophyten von Nadelbäumen, wurden ISSRs erfolgreich eingesetzt (TSUMURA et al. 1996).

#### 1.2.3.4 AFLP-Marker

Die AFLP-Technik (*amplified fragment length polymorphism*) ist eine hocheffektive Methode um *Fingerprints* von Genomen zu erzeugen. Sie beruht auf einer selektiven Amplifizierung von Restriktionsprodukten und wurde 1995 von VOß et al. entwickelt.

Der prinzipielle Ablauf besteht aus drei Einzelreaktionen, eines Restriktions-Ligations-Schrittes, einer präselektiven sowie einer selektiven Amplifikation. Die Auftrennung und Detektion der in diesen Schritten erzeugten Fragmente erfolgt via Gelelektrophorese.

##### 1. Restiktion-Ligation

Die genomische DNA wird mittels zweier Restriktionsendonucleasen, einer seltenen (6er Cutter) und einer häufigschneidenden (4er Cutter), verdaut. Allgemein gebräuchlich sind die Kombinationen *EcoRI/MseI* und *EcoRI/PstI*. In demselben Reaktionsschritt werden die Schnittenden der Restriktionsfragmente enzymatisch mit einem für die jeweilige Enzymschnittstelle spezifischen Oligonucleotid (Adaptor) verknüpft. Durch die Verwendung zweier Restriktionsenzyme wird eine hohe Anzahl von Restriktionsfragmenten erzeugt, deren Größe in dem für die Auftrennung erforderlichen Bereich, üblicherweise zwischen 50 bis 500 kb, liegt. Die Sequenz der verwendeten Adaptoren besteht aus der einsträngigen Zielsequenz des jeweiligen Enzyms am 5'-Ende sowie 14 Basenpaaren und drei überhängenden, einzelnen Basen am komplementären 5'-Ende.

##### 2. Präselektive Amplifikation

In der Restriktion-Ligation werden modifizierte DNA-Fragmente erzeugt, die als Template für eine selektive Amplifikation via PCR dienen. Dabei entstehen drei Arten von Fragmenten: Fragmente, die durch die Schnittstellen des häufig-schneidenden Enzymes terminiert werden, solche, die durch die Schnittstellen des selten-schneidenden Enzymes begrenzt werden, und schließlich solche, die am einen Ende die Zielsequenz des häufig-schneidenden Enzymes und am anderen Ende die des seltenschneidenden besitzen. Mehr als 90% der Restriktionsfragmente werden durch die Schnittstellen des häufig-schneidenden Enzymes terminiert. Diese Fragmente sind im allgemeinen jedoch sehr kurz. Dadurch können sich die komplementären terminalen Sequenzen leicht zusammenlagern und eine energetisch relativ stabile Ring-Struktur ausbilden, bei der eine Amplifikation aufgrund der Behinderung des Primer-Annealing nicht mehr ohne weiteres möglich ist. Sehr selten entstehen auch Fragmente, welche nur durch die Schnittstellen des selten-schneidenden Enzyms begrenzt werden. Diese Fragmente werden ebenfalls amplifiziert, kommen aber zu selten vor, um die Detektion zu beeinflussen. Hauptsächlich amplifiziert werden nur solche Fragmente, die zwischen den Schnittstellen beider Restriktionsendonucleasen liegen. Als Primer für die PCR dienen einsträngige Oligonucleotide, welche komplementär zu der Sequenz des Adaptors (*core sequence*) und der jeweiligen Enzymschnittstelle (*enzyme specific sequence*) sind. Die Amplifizierung wird dadurch hochspezifisch. Zusätzlich besitzen die Adaptoren jedoch noch eine variable Base (*selective extension*). Diese reduziert die Anzahl der amplifizierten Fragmente. Je Adaptor wird nur ein Viertel der möglichen Fragmente amplifiziert, insgesamt also  $\frac{1}{4^2} = \frac{1}{16}$  aller in Frage kommenden Fragmente.

### 3. Selektive Amplifizierung

Die in der präselektiven Amplifizierung erzeugten Fragmente dienen wiederum als Template für eine (weitere) selektive (Haupt-) Amplifizierung. Als selektive Primer fungieren Oligonucleotide, die neben der komplementären Sequenz zu den Adaptoren der vorherigen PCR noch zwei weitere, variable Basen besitzen. Dadurch wird die Anzahl der erzeugten Fragmente soweit reduziert, daß eine elektrophoretische Auftrennung erfolgen kann. Durch eine Veränderung der variablen Basen ist es außerdem möglich, mit jeder PCR andere Fragmente zu amplifizieren und so neue *Fingerprints* zu erzeugen. Die Detektion der Fragmente wird möglich durch die Markie-

rung eines Primers, entweder radioaktiv durch  $^{32}\text{P}$  oder nichtradioaktiv durch fluoreszierende Farbstoffe.

#### 4. Auftrennung und Detektion

Die Auftrennung der Fragmente erfolgt via Elektrophorese auf Polyacrylamid-Gelen. Da sich die Fragmente in ihrer Größe nur um wenige Basenpaare unterscheiden, ist eine Auftrennung in hochkonzentrierbaren Gelen mit großer Laufstrecke und unter hohen Spannungen erforderlich. Die Fragmente werden vor der Auftrennung denaturiert, ebenso findet die Auftrennung unter denaturierenden Bedingungen statt, damit alle Fragmente die gleiche Konfiguration besitzen und damit eine zuverlässige Trennung nach der Größe möglich ist. Ursprünglich erfolgte die Detektion der Fragmente radioaktiv. Seit 1997 wird diese jedoch zunehmend durch die nicht-radioaktive Nachweisreaktion ersetzt.

Die AFLP-Methodik verfügt über relativ viele Vorteile. Die große Anzahl der erzeugten Fragmente (100-200) pro Reaktion erhöht die Anzahl der polymorphen Fragmente erheblich. Außerdem handelt es sich aufgrund der spezifischen PCR-Primer um eine äußerst stabile und reproduzierbare Methode, die praktisch kaum durch unspezifische Reaktionen verfälscht wird. Die AFLP-Technik läßt sich leicht in einem großen Maßstab anwenden und automatisieren. Die Verwendung von nicht-radioaktiven Fluoreszenzfarbstoffen ermöglicht die automatische Auftrennung und Detektion der Fragmente sowie die Auswertung der Daten per Computer. Dadurch wird die AFLP-Technik zu einer äußerst effizienten Methode zur Erzeugung von *Fingerprints* und damit für Genomkartierungen.

## 1.3 Kartierung des pflanzlichen Genoms

### 1.3.1 Kartierungspopulationen

Die Kartierung von (Gen-)Loci erfolgt durch die Ermittlung der Häufigkeit von Crossing-over-Ereignissen zwischen zwei (Gen-)Loci, also durch die Berechnung von Rekombinationsfrequenzen. Grundlage dazu ist die Erstellung einer geeigneten Kartierungspopulation, anhand derer sich Aussagen über Rekombinationsereignisse treffen lassen. Dabei unterscheidet man verschiedene Populationstypen anhand der Häufigkeit der stattgefundenen Meiosen, welche letztlich zur Berechnung der Rekombinationsfrequenzen dienen. Zu den 1-Meiose-Kreuzungen zählen DH-Populationen (Doppelhaploide) und BC<sub>1</sub>-Populationen (*back cross*). Doppelhaploide Pflanzen werden üblicherweise durch Colchizinierung haploider Pflanzen, wie sie z.B. durch die Antherenkultur (HOFFMANN et al. 1982) entstehen, erzeugt. DH-Linien zeichnen sich durch eine vollständige Homozygotie aus, sind aber technisch relativ aufwendig. BC<sub>1</sub>-Populationen werden durch die Kreuzung zweier Eltern und einem darauffolgenden Rückkreuzungsschritt mit einem Elter (=rekurrenter Elter) erzeugt. BC<sub>1</sub>-Linien weisen, bei homozygoten Eltern, einen Heterozygotiegrad von 50% auf. 75% der genetischen Information aller Tochter-Linien stammt von rekurrenten Elter. Zu den Mehrfach-Meiose-Kreuzungen zählen Populationen bestehend aus den Tochtergenerationen nach einer Initialkreuzung (F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub> etc.) und RI-Populationen.

Rekombinante Inzuchtlinien (Abk.: RIL) entstehen durch Kreuzung zweier gänzlich homozygoter Elternlinien. Jedes Einzelkorn der F<sub>2</sub>-Generation sowie jede Einzelpflanze der Folgegeneration wird durch fortgesetzte Selbstung vermehrt (Einzelkorn-Nachkommen bzw. *single seed descent*, Abk. SSD). Mit jeder Inzucht-Generation halbiert sich der Grad der Heterozygotie in der Population. Die F<sub>5</sub>-Population ist zu 93,8% homozygot, die F<sub>6</sub>-Generation zu 96,9%. Dabei sind in den einzelnen RI-Linien Abschnitte enggekoppelter Allele (*blocks*) beider Elternlinien kombiniert und quasi fixiert. Eine Kartierung erfolgt durch die Charakterisierung jeder RI-Linie anhand ihrer individuellen Allelkombination (*fingerprint*). Für jeden Locus erhält man ein Verteilungsmuster in der Population. Je enger zwei Loci miteinander gekoppelt sind, um so ähnlicher ist deren Verteilungsmuster. Im Unterschied zu anderen Kartierungspopulationen erfolgt die Segregation in einer RI-Population durch eine Folge von Meiose-Zyklen und ist nicht von einer einzelnen Meiose abhängig.

RI-Populationen besitzen gegenüber anderen Kartierungspopulationen mehrere Vorteile. Der größte Vorteil liegt wohl darin, daß es sich bei RI-Populationen um dauer-

hafte Populationen mit (nahezu) vollendeter Segregation handelt, welche beliebig oft für Kartierungen genutzt werden können (BAILEY 1981). Daten können dadurch von verschiedenen Experimentatoren und in verschiedenen Umgebungen erhoben werden. Karten lassen sich auch durch nachträglich ermittelte Daten erweitern. Desweiteren ist jeder Genotyp durch eine RI-Linie charakterisiert. Innerhalb einer Linie sollte keine genetische Varianz vorliegen. Durch die Analyse mehrerer Einzelpflanzen pro Linie bzw. Genotyp läßt sich bei polygenen Merkmalen die Umweltvarianz leicht bestimmen. Eine Detektion von QTLs wird dadurch ebenfalls wesentlich genauer. RI-Linien sind diesbezüglich DH-Linien gleichzustellen (LYNCH & WALSH 1998).

RI-Populationen sind bezüglich einzelner Loci nahezu homozygot. Daher besitzen kodominante Markersysteme, wie RFLPs oder Mikrosatelliten, gegenüber dominanten Markersystemen, wie z.B. AFLPs oder RAPDs, keinen höheren Informationsgehalt. RI-Populationen eignen sich daher vor allem für die Anwendung PCR-gestützter Markersysteme.

Ein Nachteil von RI-Populationen liegt nach der Beobachtung von BURR & BURR (1991) allerdings darin, daß in markerarmen Regionen Kopplungsabstände über 20 cM nicht signifikant nachgewiesen werden können. Zu ähnlichen Schlüssen gelangten auch REITER et al (1992) und PARAN et al. (1995).

HALDANE & WADDINGTON (1931) zeigten, daß die Rekombinationsrate für enggekoppelte Loci bei einer Selbstung doppelt so hoch ist wie normal. Dieses hat zweierlei zur Folge: Zum einen ist es in der Entstehungsphase einer Karte schwieriger eine Kopplung zwischen einzelnen Markern, also Kopplungsgruppen, zu etablieren. Andererseits können dadurch in einem fortgeschrittenen Status der Karte Rekombinationen auch zwischen enggekoppelten Markern detektiert werden. Für Markerdistanzen unter 12,5 cM wird die Auflösung der Karte genauer (BURR et al. 1988). Die Auflösung der Karte steigt mit der Anzahl der analysierten Linien. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\alpha = 5\%$  liegt der Grenzwert für eine zuverlässige Auftrennung zweier enggekoppelter Loci in einer RI-Population mit 50 Linien bei 3,8 cM, bei einer Population mit 100 Linien bei 2,1 cM (BURR et al. 1988).

Erstmals angewendet wurden RI-Populationen 1966 von BRIM bei der klassischen Selektion von Soja-Pflanzen. In der Molekulargenetik werden RI-Populationen seit den 70er Jahren verwendet. Insbesondere bei der Kopplungsanalyse des Mäuse-Genoms wurden hauptsächlich RI-Populationen verwendet (BAILEY 1981). DOMONEY et al. erstellten 1986 eine RI-Population von der Erbse für die Kartierung von Legu-

min-Genen. 1988 folgten die ersten RI-Populationen für monokotyle Pflanzen (Mais: BURR et al. 1988)

Bei allen Kulturleinsorten erfolgt die Vermehrung überwiegend durch Selbstbefruchtung. Je nach Sorte können jedoch Fremdbefruchtungen in unterschiedlich hohem Maße vorkommen. Maximal beträgt der Anteil an Fremdbefruchtung 4% (HOFFMANN et al. 1985). In der Züchtung wird der Lein zu den Liniensorten gezählt. Aus diesen Gründen eignet sich der Lein in geradezu idealer Weise für die Entwicklung einer RI-Population.

### 1.3.2 Genomische Karten

Während der Meiose kommt es häufig zu intrachromosomalen Rekombinationen (Crossing-over-Ereignisse), d.h. es kommt zu einem Austausch genetischen Materials zwischen zwei Nicht-Schwester-Chromatiden. Betrachtet man zwei (Gen-)Loci, welche auf demselben Chromosom lokalisiert sind, wird es zwischen diesen beiden Chromosomen mit einer gewissen Häufigkeit zu solchen Rekombinationen kommen. In Näherung läßt sich sagen: Je weiter zwei Loci voneinander entfernt sind, umso häufiger werden Rekombinationsereignisse zwischen ihnen auftreten. Erstmals untersucht wurden diese Gesetzmäßigkeiten von Sturtevant und Morgan Anfang des 20. Jahrhunderts (STURTEVANT 1965). Als Größe für Rekombinationsfrequenzen etablierte sich die genetic map unit (m.u.), als Maßeinheit gilt das Centimorgan (cM). 1 m.u. = 1 cM repräsentiert eine Rekombinationsfrequenz von 0,01 = 1%, d.h. 1 von 100 Meioseereignissen weist in dem beobachteten Bereich eine Rekombination auf. Seit Anfang des 20. Jahrhunderts werden Kopplungskarten erstellt. Umfangreiche Kopplungskarten, deren Daten aus zahlreichen klassischen Kreuzungsversuchen sowie aus der Einführung von chemisch- oder radioaktiv-induzierten Mutationslinien stammen, sind mittlerweile sowohl für die häufigsten Kulturpflanzen sowie für eine Reihe von Modellpflanzen publiziert.

Seit der Entwicklung molekularer Marker werden diese auch zur Erstellung genetischer Kopplungskarten genutzt. 1993 waren bereits für über 30 Pflanzenarten molekulare Karten vorhanden (O'BRIEN 1993). Ziel ist es klassische und molekulare Karten miteinander zu Konsensus-Karten (integrierte bzw. kombinierte Karten) zu kombinieren. Diese Karten sollten mehrere Bedingungen erfüllen: Zum einen sollten sich alle bekannten Gene auf ihnen lokalisieren lassen. Zudem sollte die Markerdichte dieser Karte sehr hoch sein (*high density map*). Außerdem sollte die Karte mit den

cytologischen Befunden übereinstimmen, d.h. jede Kopplungsgruppe sollte einem Chromosom entsprechen und die Marker der jeweiligen Chromosomenenden sollten eine enge Kopplung mit den Telomersequenzen aufweisen. Insgesamt sollte eine Konsensuskarte das gesamte genetische Potential einer Art abdecken. Die Berechnung kombinierter Kopplungskarten erfolgt mit dem Computerprogramm JoinMap (STAM 1993). HAUGE et al. (1993) wendeten dieses Programm zu der Berechnung einer Konsensuskarte von *Arabidopsis thaliana* L. aus zwei RFLP-Karten und einer klassischen Karte an. Mittlerweile wurden Konsensus-Karten für viele Nutzpflanzen publiziert (Tomate, Kartoffel: TANKSLEY et al. 1992; Reis: BÖRNER & KORZUN 1998; Gerste: BECKER et al. 1995, MOHLER 1998; Hirse: DUFOUR et al. 1997; Avocado: SHARON et al. 1997; Pinie: SEWELL et al. 1998; Sonnenblume: GENTZBITTEL et al. 1995). Für den Kulturlein wurde bisher nur eine Kopplungskarte auf der Basis molekularer Marker publiziert (SPIELMEYER et al. 1998a,b). Grundlage für diese Analyse waren 143 DH-Linien entwickelt aus F<sub>2</sub>-Nachkommen einer Kreuzung der australischen Öllein-Kultursorten Glenleg und Linola. Insgesamt konnten SPIELMEYER et al. neben zwei morphologischen Markern (Samen- und Blütenfarbe) und 8 RFLP-Markern auch 187 AFLP-Marker in 18 Kopplungsgruppen kartieren. Diese Karte deckt einen Bereich von ca. 1.400 cM ab. Der mittlere Kopplungsabstand liegt bei 10 cM pro Marker. Klassische Genkarten oder Konsensus-Karten sind für den Lein nicht verfügbar.

### 1.3.3 Kartierung von quantitativen Eigenschaften (QTLs)

In vielen Fällen wird die Ausprägung eines phänotypischen Merkmales nicht nur durch ein einziges Gen sondern durch das Zusammenwirken mehrerer Gene gesteuert. Solche Merkmale polygenen Ursprunges zeichnen sich durch eine graduelle Variation aus, sie werden daher als quantitative Merkmale bezeichnet. Die Variation in der Merkmalsausprägung wird bedingt durch eine unterschiedliche Wirkung der einzelnen Gene und durch eine unterschiedlich große Gen-Umwelt-Interaktion. Dieses führt dazu, daß quantitative Merkmale nicht direkt mit den Mendelschen Vererbungsregeln vereinbar scheinen.

Unter der Annahme, daß alle genetischen Faktoren den gleichen Effekt auf die Merkmalsausprägung besitzen, läßt sich jedoch zeigen, daß innerhalb einer genügend großen Population die unterschiedlichen genetischen Faktoren eine Klassenbildung innerhalb des polygenen Merkmales bedingen. Diese wiederum folgen in ihrer Vererbung den Mendelschen Regeln. Ordnet man alle Individuen der beobachte-



ten Population diesen Klassen zu, so ergibt sich innerhalb der Population bezüglich des quantitativen Merkmales eine Normalverteilung (JOHANNSON 1913).

Auf quantitative Merkmale können sich in unterschiedlichem Umfange auch Umwelteinflüsse auswirken. Im allgemeinen folgen die Umwelteinflüsse ebenfalls einer Normalverteilung. Der Umwelteinfluß kann auf die Wirkung der einzelnen Gene einen unterschiedlich großen Einfluß haben.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Vererbung quantitativer Merkmale durch die Effekte einzelner Gene in Zusammenspiel mit erklärten und nicht erklärten Umwelteffekten erfolgt (FALCONER 1984). Die Genloci, welche an der Ausprägung quantitativer Eigenschaften beteiligt sind, werden als „*quantitative trait loci*“ (Abk.: QTL) bezeichnet (GELDERMANN 1975).

Es existieren eine Reihe von methodischen Ansätzen zur Analyse von QTLs. Eine umfassende Beschreibung aller Ansätze findet man bei BACKES (1995) sowie LYNCH & WALSH (1998). An dieser Stelle soll nur kurz auf die Grundlagen sowie die optimalsten Vorgehensweisen eingegangen werden.

Grundlage einer QTL-Analyse ist, wie bei jeder Genomanalyse, die Erstellung einer geeigneten Kreuzungspopulation. Durch die Wahl möglichst divergenter Kreuzungseltern wird die Höhe der genetischen Varianz innerhalb der Population festgelegt. Daraus resultiert die Anzahl der detektierbaren QTLs ebenso wie die Größe der durch die QTLs erklärten Varianz und die Verteilung der QTL-Effekte. In Kombination mit der Erstellung einer molekularen Karte hat außerdem die Divergenz der Kreuzungseltern Einfluß auf die Anzahl der detektierbaren Markerloci.

Auch die Kreuzungspopulation hat erheblichen Einfluß auf die QTL-Analyse. Innerhalb der einzelnen Linien sollte eine möglichst niedrige Varianz auftreten; ebenso sollten die Linien über einen hohen Informationsgehalt verfügen. Die statistische Güte der QTL-Analyse hängt in hohem Maße von der Zuverlässigkeit und Konstanz der Merkmalsausprägung in den Linien ab. Anhand von Modellrechnungen läßt sich die Eignung verschiedener Populationstypen abschätzen (COWEN 1988, VAN OOIJEN 1992, CARBONELL et al. 1993). Am größten ist die statistische Signifikanz von QTLs in DH-Populationen. Einkornrarnschnachkommen der  $F_1$ -Generation,  $F_{2:3}$ -Populationen,  $F_2$ -Populationen und  $BC_1$ -Populationen sind z.T. wesentlich schlechter für QTL-Analyse geeignet. In jeder dieser Populationen nimmt die statistische Güte der detektierten QTLs ab (BACKES 1995). Bei DH-Linien liegt innerhalb der einzelnen Linien eine nahezu vollständige Homozygotie vor, sie sind daher von ihrem Informationsge-

halt her RI-Linien gleichzusetzen (LYNCH & WALSH 1998). Gleichfalls Einfluß auf die Güte der QTLs haben die Anzahl der beobachteten Nachkommen (ELLIS 1986) sowie die Anzahl und Verteilung der Marker (LANDER & BOTSTEIN 1989).

Idealerweise wird die QTL-Analyse an einer Population durchgeführt, zu der bereits eine Kopplungskarte existiert (BACKES 1995). Diese Karte sollte eine genügend hohe Dichte an Markern aufweisen. Gerade mit molekularen Markern sind hochauflösende Kopplungskarten in relativ kurzer Zeit und mit relativ wenig Arbeitsaufwand zu erstellen (VOS et al. 1995). Erste Arbeiten beschränkten sich darauf, einzelne enggekoppelte Marker zu QTLs zu suchen (z.B. OSBORN et al. 1987). Bei der Verwendung von Kopplungskarten werden QTLs jedoch für die Intervalle zwischen den Markern berechnet (Intervallkartierung). Dadurch werden die detektierten QTLs nicht nur statistisch abgesichert, es wird zu dem eine Schätzung des QTL-Effektes ohne die durch den Kopplungsabstand verursachte Verfälschung möglich (LANDER & BOTSTEIN 1989). Außerdem sind Intervallanalysen gegen Abweichungen von der Normalverteilung bei der Merkmalsausprägung deutlich unempfindlicher (KNOTT & HALEY 1992).

Durch die Verwendung von Markern als Cofaktoren bei der Intervallanalyse kann die Auflösung und die Genauigkeit der QTL-Detektion erheblich gesteigert werden (UTZ & MELCHINGER 1994). Diese *composite interval mapping* (Abk.: CIM) Methode stellt die derzeit effektivste Methode zur Lokalisierung von QTLs dar (LYNCH & WALSH 1998).

Durch eine Intervallkartierung können die QTL-detektierenden Marker im Kopplungszusammenhang betrachtet werden. Eine Fehlinterpretation untereinander gekoppelter Markerloci als Markerloci für mehrere QTLs kann so vermieden werden (KEIM et al. 1990). Können auf einer Kopplungskarte QTLs für mehrerer polygene Eigenschaften kartiert werden, besteht zudem die Möglichkeit, Zusammenhänge zwischen einzelnen QTLs herzustellen. Auf diese Weise lassen sich unter Umständen gleiche Geneffekte auf unterschiedliche Eigenschaften nachweisen (EDWARDS et al. 1992).

Wird als Grundlage der QTL-Detektion eine Konsensuskarte mit Korrelation zu den Chromosomen verwendet, können aufgrund des höheren genetischen Hintergrundes Markerloci für QTLs in mehreren Sorten/Arten bestimmt werden (PATERSON et al. 1991). Außerdem können QTLs so auch physikalisch lokalisiert werden, d.h. einzelnen Chromosomensegmenten zugeordnet werden (TANKSLEY 1993).

QTL-Analysen wurden für eine Reihe von Merkmalen an verschiedenen Nutzpflanzen, hauptsächlich Getreiden, durchgeführt. Eine ausführliche Übersicht über die bis 1995

erschienenen Arbeiten gibt BACKES (1995). Für den Kulturlein wurden QTLs zu der Resistenz gegenüber der Flachswelke (*Fusarium oxysporum* lini) gefunden (SPIELMEYER et al. 1998a). Anhand einer Analyse von 59 DH-Linien konnten zwei QTLs detektiert werden und in einer molekularen Karte kartiert werden. Beide QTLs erklären 38% bzw. 26% der phänotypischen Varianz, die statistische Signifikanz (LOD) beträgt 7,3 bzw. 3,4. Bei beiden Loci handelt es sich um Gene mit einem additiven Effekt.

## 1.4 Analyse der genetischen Diversität

### 1.4.1 Distanzberechnungen

Individuen lassen sich auf vielfältige Art und Weise anhand von charakteristischen Merkmalen unterscheiden. Die einfachste und naheliegendste Methode ist die Analyse einzelner morphologischer Eigenschaften und deren Vergleich zwischen den Individuen. Eine unterschiedliche Morphologie setzt unterschiedliche Stoffwechselprozesse und damit eine unterschiedliche Enzymausstattung voraus. Dieses wiederum ist bedingt durch eine unterschiedliche genetische Struktur. Unterschiede aller dieser Organisationsstufen lassen sich zur Charakterisierung von Individuen verwenden. Aus der Summe aller unterschiedlichen Merkmale zwischen zwei Individuen läßt sich deren Ähnlichkeit und damit ihre Verwandtschaft bestimmen. Dieses Prinzip ermöglicht nicht nur die Ermittlung einer Verwandtschaft zwischen Individuen selbst, sondern auch zwischen Klassen von Individuen anhand einzelner Vertreter (Rassen, Arten etc.).

Im einfachsten Fall lassen sich Unterschiede durch binäre Variablen beschreiben. Dabei können diese Variablen nur zwei Zustandswerte, nämlich 1 (= Eigenschaft vorhanden) oder 0 (= Eigenschaft fehlt), annehmen. Im Vergleich zweier Individuen (Beobachtungen)  $i_1$  und  $i_2$  für eine Variable  $j$  ergeben sich vier mögliche Kombinationen:

- Die Eigenschaft fehlt bei beiden Individuen (= ,00').
- Die Eigenschaft fehlt bei Individuum  $i_1$ , ist aber bei Individuum  $i_2$  vorhanden (= ,01').
- Die Eigenschaft ist bei Individuum  $i_1$  vorhanden, fehlt aber bei Individuum  $i_2$  (= ,10').
- Die Eigenschaft ist bei beiden Individuen vorhanden (= ,11').

Erweitert man diese Beschreibung auf eine beliebige Anzahl von Variablen  $J$ , so lassen die einzelnen Kombinationen quantifizieren.  $N_{00}$  entspricht dann der Anzahl des Auftretens der Kombination 00 zwischen zwei beliebigen Individuen  $i_1$  und  $i_2$  in jeder einzelnen Variablen  $j$ ,  $j = 1, 2, \dots, J$ . Analoges gilt für  $N_{01}$ ,  $N_{10}$  sowie  $N_{11}$ . Anhand dieser Größen läßt sich die Distanz bestimmen, allerdings existieren eine Reihe unterschiedlicher Berechnungsmethoden. Alle diese Methoden unterscheiden sich im Prinzip nur durch eine unterschiedliche Gewichtung der einzelnen Kombinationen. Dieser Gewichtung wird im folgenden mit dem Parameter  $v$  Rechnung getragen, wobei  $v_1$  selbst in kontinuierlicher Weise die Übereinstimmungen,  $v_2$  dagegen die Nicht-Übereinstimmungen wichtet.

Vielen Berechnungsmethoden für die Distanz  $d_{ii'}$  zwischen zwei Individuen  $i$  und  $i'$  liegt der verallgemeinerte Simple-Matching-Koeffizient zugrunde:

$$d_{ii'} = 1 - \frac{v_1(N_{11} + N_{00})}{v_1(N_{11} + N_{00}) + v_2(N_{10} + N_{01})} \quad [1]$$

Das Verhältnis aller Kombinationen, welche Gemeinsamkeiten beschreiben, zu allen möglichen Kombinationen beschreibt den Umfang der Ähnlichkeit zwischen zwei Individuen. Der inverse Wert dieser Größe, also  $1 - d_{ii'}$ , ergibt das Maß der Distanz bzw. der Unähnlichkeit. Für den Koeffizienten nach Rogers und Tanimoto gilt  $v_1 = 1$ ;  $v_2 = 2$  und für den Koeffizienten nach Sokal und Sneath, 2. Variante gilt  $v_1 = 2$ ;  $v_2 = 1$ . Der spezielle Simple-Matching-Koeffizient nutzt  $v_1 = v_2 = 1$ .

Alternativ läßt sich die Distanz nach dem verallgemeinerten Jaccard-Koeffizienten berechnen:

$$d_{ii'} = 1 - \frac{v_1 N_{11}}{v_1 N_{11} + v_2 (N_{10} + N_{01})} \quad [2]$$

Diese Grundlage gilt für die Koeffizienten nach Jaccard ( $v_1 = v_2 = 1$ ), nach Sokal und Sneath, 1. Variante ( $v_1 = 1$ ;  $v_2 = 2$ ) sowie für den Koeffizienten nach Czekanowski bzw. Dice ( $v_1 = 2$ ;  $v_2 = 1$ ). Der verallgemeinerte Jaccard-Koeffizient bestimmt Ähnlichkeiten ausschließlich mittels  $N_{11}$ , also dem gemeinsamen Vorhandensein einer Eigenschaft. Das gemeinsame Fehlen einer Variablen wird nicht mit in die Berechnung einbezogen.

Eine genaue Beschreibung der einzelnen Formeln sowie deren Herleitung und Hinweise zur Anwendung findet sich in MUCHA (1992) und BACKHAUS et al. (1996).

Für eine Bestimmung der genetischen Diversität etablierte sich der Koeffizient nach DICE (bzw. CZENKANOWSKI) =  $GD_{DICE}$ :

$$GD_{Dice} = 1 - \frac{2N_{11}}{2N_{11} + N_{10} + N_{01}} \quad [3]$$

Häufig findet man auch seine Anwendung als Ähnlichkeitsmaß  $GS_{DICE}$ :

$$GS_{Dice} = \frac{2N_{11}}{2N_{11} + N_{10} + N_{01}} = \frac{2N_{ij}}{N_i + N_j} \quad [4]$$

$N_i$  bzw.  $N_j$  entsprechen dabei der Anzahl aller vorhandenen Eigenschaften in den Individuen  $i$  bzw.  $j$ .  $N_{ij}$  repräsentiert die Anzahl aller gemeinsamen Eigenschaften der Individuen  $i$  und  $j$ . Damit gibt Formel [4] gleichsam die Wahrscheinlichkeit dafür an,

daß man eine Eigenschaft des Individuums  $i$  auch in dem Individuum  $j$  wiederfindet. Das Ähnlichkeitsmaß  $GS_{DICE}$  wurde 1945 von DICE entwickelt, und 1979 von NEI und LI erstmalig zur Analyse der genetischen Variation zwischen Individuen eingesetzt. Das Distanzmaß  $GD_{DICE}$  [3] wird daher häufig auch als  $GD_{Nei}$  bezeichnet. Im Vergleich zu anderen Distanzkoeffizienten besitzt der Koeffizient nach DICE mehrere Vorteile. In der Form

$$D_{ij} = [GD_{Dice}]^{\frac{1}{2}} \quad [5]$$

gibt er die Unterschiede zwischen zwei Genotypen in Form von euklidischen Distanzen an (MUMM et al. 1994). Dadurch ist es möglich Distanzen zwischen mehreren Genotypen graphisch in Form einer multidimensionalen Skalierung (MDS) darzustellen. Dabei werden einzelne Genotypen in Form von Punkten im zwei- bis mehrdimensionalen Raum so positioniert, daß der Abstand zwischen zwei Genotypen proportional zu ihrer genetischen Distanz ist. Auf diese Weise können Beziehungen unter den verschiedenen Genotypen verdeutlicht werden.

Das Distanzmaß nach DICE ist von allen Distanzkoeffizienten am besten für eine Diversitätsanalyse anhand von molekularen Markerloci geeignet. LAMBOY (1994) wies nach, daß der Koeffizient nach DICE bei RAPD-Markerdaten von Bandenartefakten weniger beeinflusst wird als andere Koeffizienten. Auch zur Analyse von RFLP-Daten erwies sich der Koeffizient nach DICE als besser geeignet (MUMM et al. 1994). Zudem erlaubte dieses Distanzmaß eine Interpretation bezüglich eines Zusammenhanges zwischen RFLPs und Unterschieden in der DNA-Sequenz.

#### 1.4.2 Clusteranalyse

Die Berechnung der genetischen Distanz zwischen mehreren Genotypen liefert stets nur Aussagen über die Relation zweier individueller Genotypen zueinander. Um jedoch die Verhältnisse zwischen allen betrachteten Genotypen zu erfassen, ist eine graphische Umsetzung der Distanzdaten erforderlich. Eine Möglichkeit dazu ist die bereits erwähnte Hauptkomponentenanalyse, also die Berechnung der euklidischen Distanzen nach Gleichung [5] sowie deren Darstellung in einem mehrdimensionalen Raum (Multidimensionale Skalierung).

Eine andere Möglichkeit zur Berechnung der Beziehungen zwischen mehreren Genotypen ist die hierarchische agglomerative Clusteranalyse und die nachfolgende Darstellung der Ergebnisse in einem zweidimensionalen Dendrogramm. Die Clusteranalyse bildet Klassen von Einzelfällen mit ähnlicher Distanz zueinander. Dabei

werden in mehreren Schritten ausgehend von „Start“-Klassen, welche die Fälle mit den kleinsten Distanzen umfassen, die sich ähnlichsten Klassen sukzessive zu neuen, größeren Klassen vereinigt. Das Dendrogramm gibt den Prozeß dieser Hierarchiebildung wieder.

Es existieren mehrere mathematische Ansätze zur Clusteranalyse, die sich nach der Art der Klassifikationsmethode, d.h. nach den Formeln zur Berechnung der Abstände zwischen den Klassen, unterscheiden. Verwandtschaftsanalysen auf der Basis molekularer Marker werden im allgemeinen entweder nach der Average-Linkage-Methode oder nach der Methode nach WARD durchgeführt.

Die Average-Linkage-Methode, häufig auch als UPGMA (*unweighted pair group method with arithmetic average*) bezeichnet, beruht auf der Bestimmung des Abstandes zwischen zwei Klassen aufgrund des Mittelwertes aller paarweisen Distanzen der Fälle innerhalb der Klasse.

Die Methode nach WARD (Minimalvarianzmethode) fusioniert die Klassen miteinander, durch die sich die Varianz der Distanzen innerhalb der Klassen am wenigsten vergrößert. Im Gegensatz zu der Average-Methode orientiert sich die Methode nach WARD am euklidischen Vektorraum. Weitere Berechnungsformen, auf welche hier allerdings im einzelnen nicht näher eingegangen werden soll, sind die Single-Linkage-Methode, die Complete-Linkage-Methode sowie Zentroid-Methode (UPGCM).

MUMM & DUDLEY (1994) führten einen Vergleich aller Clusterungsmethoden anhand einer Analyse von 27 Mais-Linien durch. Bezüglich der Gruppenzugehörigkeit ergaben sich keine Unterschiede bezüglich der einzelnen Berechnungsmethoden. Allerdings zeigte die Average-Linkage-Methode die größten Übereinstimmungen mit den Verwandtschaftsbeziehungen, welche aus den Kreuzungsdaten abgeleitet werden konnten.

## 1.5 Ziele dieser Arbeit

Wie eingangs erläutert, wird trotz der vielfältigen Nutzungsmöglichkeiten der Leinpflanze und ihrer jahrtausendealten Anbautradition in Deutschland gegenwärtig kaum mehr Lein angebaut. Die Züchtung neuer Kulturleinsorten findet ebenfalls nur noch vereinzelt statt. Daher soll diese Arbeit dazu beitragen, neue, molekulargenetisch orientierte Ansätze zur Kulturleinzüchtung zu schaffen, welche die Wirtschaftlichkeit sowohl der Leinzüchtung als letztendlich auch des Leinanbaus steigern.

Über den Kulturlein wurden im Gegensatz zu den meisten anderen Kulturpflanzen bislang kaum molekulargenetische Analysen veröffentlicht. Einzig die Resistenzgene gegen den Flachs-Rost *Melampspora lini* (Ehrenb.) Lév. waren Gegenstand umfangreicher Untersuchungen (ELLIS et al. 1992, ELLIS et al. 1997). So gehören die Resistenzgene L6 und M mit zu den ersten klonierten pflanzlichen Resistenzgenen überhaupt. RFLP-Marker, welche diese Flachsrostresistenzgene detektieren, stellen bislang die einzige Anwendung molekularer Marker in der Leinzüchtung dar. In dieser Arbeit sollen daher weitere Markertechniken, insbesondere PCR-gestützte Markertechniken, auf den Kulturlein übertragen und angewendet werden.

Grundlage jeder weitergehenden Genomanalyse, insbesondere einer kartengestützten Klonierung (*map based cloning*) von einzelnen Genen, ist die Erstellung einer Kopplungskarte mittels molekularer Marker. Eine solche Karte soll für zwei RI-Populationen erstellt werden. Gleichfalls soll der Versuch unternommen werden, anhand dieser Kopplungskarten eine populationsübergreifende Konsenskarte zu berechnen.

Eine der wichtigsten Zuchtziele in der Ölleinzüchtung ist die Züchtung von Sorten, welche eine auf die jeweilige industrielle Verwendung ausgerichtete Fettsäurezusammensetzung im Leinöl zeigen. Bislang erfolgte die Züchtung solcher Sorten über die Einführung chemisch induzierter Mutationslinien. Eine Selektion fand nur über die langwierige und kostenintensive Analyse des Leinöls statt. Die markergestützte Selektion könnte daher eine schnellere und preiswerte Alternative zu den bisherigen Zuchtmethoden darstellen. Daher soll in dieser Arbeit der Versuch unternommen werden, Gene, welche die Biosynthese der Fettsäuren regulieren, im Zuge einer Intervallkartierung (*combined interval mapping*) als QTL (*quantitative trait loci*) in den



---

erstellten Kopplungskarten zu lokalisieren. Die flankierenden Marker der entsprechenden Chromosomenbereiche können dann zur Etablierung einer markergestützten Selektion dienen und so neue Perspektiven in der Leinzüchtung eröffnen.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Pflanzenmaterial

#### 2.1.1 Sortenmaterial

Zur Genomkartierung von *Linum usitatissimum* L. standen mehrere mögliche Kartierungspopulationen zur Auswahl. Um eine geeignete Population auszuwählen, wurde eine Diversitätsanalyse der Kreuzungseltern, hauptsächlich mittels molekularer Marker, durchgeführt. Gleichzeitig diente diese Analyse zur Evaluierung der Diversität innerhalb der heutigen Kultursorten. Die Diversitätsanalyse wurde an insgesamt neun Kultursorten durchgeführt. Das Sortenmaterial wurde uns von Herrn Prof. Dr. W. FRIEDT, Justus-Liebig-Universität, Gießen, von Herrn Prof. Dr. S. KNAPP, Oregon-State-Universität, Ohio, USA, sowie von Herrn H. BUSCH, DSV, Lippstadt, zur Verfügung gestellt.

**Tab. 5:** Eigenschaften der analysierten Kultursorten.

Sorte	Abk.	Typus	Status	Ursprungsland	Blüte	Samen
<b>Argos</b>	Ag	Faserlein	Kultursorte	k.A.	k.A.	braun
<b>Ariane</b>	Ar	Faserlein	Kultursorte	Frankreich	blau	braun
<b>Cascade</b>	Ca	Faserlein	Kultursorte	USA	blau	braun
<b>Hermes</b>	He	Faserlein	Kultursorte	k.A.	k.A.	braun
<b>Viking</b>	Vi	Faserlein	Zuchtlinie	Belgien	blau	braun
<b>Atalante</b>	At	Öllein	Kultursorte	Frankreich	blau	braun
<b>Linore</b>	Li	Öllein	Kultursorte	k.A.	k.A.	braun
<b>McGregor-E1747</b>	MG	Öllein	Kultursorte	Kanada	blau	braun
<b>Szegedi62</b>	Sz	Öllein	Kultursorte	Ungarn	blau	gelb

k.A. = Es liegen keine Angaben vor.

Die Anzucht der Pflanzen erfolgte im Gewächshaus. Mehrere Einzelpflanzen jeder Sorte bzw. Linien wurden in Plastiktöpfen (4.000 cm<sup>3</sup>) auf Floratorf/Komposterde (1:1) kultiviert. Nach der Aussaat erfolgte eine Anschubdüngung mit Blaukorn-Langzeitdünger. Die Bewässerung erfolgte automatisch 3x täglich. Als Grenzwerte für eine Beheizung wurden 14° C, für eine Lüftung 20° C gewählt. Während der Sommermonate wurde das Gewächshaus mittels Schattierfarbe gegen zu intensive Sonneneinstrahlung geschützt.

### 2.1.2 Population I [SzegeDi62 x Atalante]

Zur Genomkartierung wurden zwei spaltende RI-Populationen verwendet.

Die Population I entstand aus einer Kreuzung zwischen SzegeDi62 und Atalante. SzegeDi62 ist eine moderne Öllein-Züchtung aus Ungarn. Diese Sorte zeichnet sich durch einen hohen Wuchs und geringer Basalverzweigung aus. Die Blütenfarbe ist blau, die Samenfarbe, wie für Ölleine typisch, gelb. Atalante ist eine Öllein-Kultursorte aus Frankreich. Ihre Wuchsform ist mittelhoch mit reicher Basalverzweigung. Die Blütenfarbe ist blau, die Samenfarbe ist braun. Atalante war bis 1996 im Landes-Sortenversuch (Bayern). Diese Population wurde uns als eine RI-Population in der F<sub>4</sub>-Generation von Prof. Dr. W. Friedt, Justus-Liebig-Universität Gießen, zur Verfügung gestellt und von uns bis zur F<sub>7</sub>-Generation weitergeführt. Zur Kartierung wurde die F<sub>6</sub>-Generation verwendet. Diese Population umfaßt 168 unselektierte Einzelkorn-Nachkommen.

Die Kreuzung wurde reziprok angelegt. Zur Kartierung wurden 58 Linien aus der ersten Kreuzung und 55 Linien aus der zweiten Kreuzung zufällig ausgewählt. Insgesamt wurden für die molekularen Analysen 113 Linien verwendet (Übersicht s. Anhang).

### 2.1.3 Population II [Viking x McGregor-E1747]

Population II wurde aus einer Kreuzung der Sorte Viking mit der Zuchtlinie McGregor-E1747 entwickelt. Viking ist eine traditionelle belgische Faserleinsorte (*Linum usitatissimum* L. subsp. *usitatissimum* convar. *elongatum* var. *elongatum*). Ihr Wuchs ist mittelhoch mit starker Basalverzweigung. Die Blütenfarbe ist blau, die Samenfarbe ist dunkelbraun. Diese Sorte läßt sich deutlich von der gleichnamigen USamerikanischen Ölleinsorte Viking abgrenzen. Letztere besitzt weiße Blüten sowie gelbe Samen. Die Zuchtlinie McGregor-E1747 wurde aus der kanadischen Ölleinsorte McGregor entwickelt. Durch Behandlung der Samen mit Ethylmethansulfonat (EMS) wurde eine stabile Mutante erzeugt, welche einen erhöhten Anteil an Linolsäure bei gleichzeitig verringertem Anteil an Linolensäure zeigt. Sie wurde 1990 erstmals von Rowland beschrieben. Die Stamm-Sorte McGregor war bis 1996 im Landes-Sortenversuch (Bayern) und wurde bis 1995 in der beschreibenden Sortenliste (Bundesortenamt) geführt. Die Population wurde uns in der F<sub>5</sub>-Generation von Prof. Dr. S. KNAPP, Oregon-State-Universität, Ohio, zur Verfügung gestellt. Insgesamt umfaßt

Population II 176 unselektierte Einzelkorn-Nachkommen, von denen 89 Linien zur genetischen Analyse zufällig ausgewählt wurden (Übersicht s. Anhang).

## 2.2 Molekulare Analyse

### 2.2.1 DNA-Extraktion

Die Extraktion genomischer Lein-DNA erfolgte nach einer modifizierten CTAB-Methode (SAGHAI-MAROOF 1984).

Das Pflanzenmaterial wurde ca. 3-4 Wochen nach der Keimung geerntet. Zur DNA-Extraktion wurden nur die jungen Blätter sowie die Stengelspitzen verwendet. 3-4 g frisches Blattmaterial wurden in Falcon-Gefäßen bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Der Zellaufschluß erfolgte durch Mörsern unter ständiger Kühlung durch flüssigen Stickstoff. Das gefrorene, gemörserte Material wurde danach in einer auf  $65^{\circ}\text{C}$  vorgewärmten CTAB-Extraktionslösung (3 ml 2x CTAB + 20  $\mu\text{l}$   $\beta$ -Mercaptoethanol pro g Frischmaterial) durch kurzes Vortexen gelöst und 1,5 h bei  $65^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad inkubiert. Nach dem Abkühlen auf Eis wurde 1 Vol. Chloroform auf das gelöste Pflanzenmaterial gegeben, anschließend wurde die Lösung 20 min auf einem Überkopfschüttler durchmischt. Die Trennung der wässrigen von der organischen Phase erfolgte via 10 min Zentrifugation bei 2.657x g. Die wässrige Phase wurde abgezogen und in ein neues, steriles Falcon-Gefäß überführt. Die Lösung wurde erneut chloroformiert, zentrifugiert, abgezogen und in ein neues Falcon-Gefäß überführt. Anschließend wurde zu der wässrigen Phase 10  $\mu\text{l/g}$  FG RNase zugegeben und die Lösung bei  $30^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad 30 Min inkubiert. Die DNA-Fällung erfolgte durch Zugabe von 1 Vol.  $-20^{\circ}\text{C}$  kalten Isopropanols. Mittels einer Pasteurpipette wurde die DNA in ein 2,0 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Die gelöste DNA wurde mehrmals gewaschen, zuerst 20 min in 76% Ethanol mit 0,2 M NaAc, danach 2x 24 h in 70% Ethanol. Die gefällte DNA wurde getrocknet und in TE-Puffer rückgelöst. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte per Intensitätsvergleich zwischen der DNA-Lösung und bekanntem Längensstandard ( $\lambda$ /HindIII) auf einem 0,8% Agarosegel.

### 2.2.2 RAPD-Analyse

Je RAPD-Reaktion wurde folgender Reaktionsansatz (Gesamtvolumen: 20  $\mu\text{l}$ ) unter ständiger Eiskühlung pipettiert:

**Tab. 6:** Zur RAPD-Reaktion eingesetzte Stoffmengen.

Reagenz	Konzentration der Stammlösung	Volumen je Reaktionsansatz	Endkonzentration
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>		7,64 µl	
PCR-Puffer	10x	2,00 µl	1x
Q-Solution	5x	4,00 µl	1x
dNTP-Mix	je 10 µM	0,20 µl	je 0,1 µM
Primer	2 µM	2,00 µl	0,2 µM
Taq-DNA-Polymerase	5 U/µl	0,16 µl	0,04 U/µl
genomische DNA	5 ng/µl	4,00 µl	20 ng/ 20 µl

Die DNA wurde in 0,5 ml Eppendorf-Gefäßen vorgelegt. Aus den anderen Reagenzien wurde ein Mastermix hergestellt. Der Mastermix wurde kurz gemischt, abzentrifugiert und auf die DNA pipettiert. Der Reaktionsansatz wurde mit 2 Tropfen Mineralöl überschichtet und abzentrifugiert. Für die Hotstart-PCR wurde ein Hybaid Omni-gene Thermocycler ohne Deckelheizung nebenstehender Programmierung verwendet (Tab. 7).

**Tab. 7:** Thermocycler-Programm zur RAPD-PCR.

Schritt	Dauer	Temperatur	
1	3 min	94° C	Denaturierung
2	10 sec	94° C	Denaturierung
3	20 sec	36° C	Annealing
4	30 sec	72° C	Extension
5	15 min	72° C	
6	30 min	30° C	
7	∞	20° C	
Schritt 2-4 wurde 40x wiederholt.			

Das Reaktionsprodukt wurde abzentrifugiert. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20° C. Für die Detektion der Fragmente wurden die Proben mit 5 µl Auftragepuffer (5x) sowie 40 µl Chloroform zur besseren Trennung der Phasen gemischt. Je 20 µl der wässrigen Phase des Reaktionsansatzes wurden auf ein 1%-Agarose-TAE-Gel aufgetragen, die angelegte Spannung betrug 70 V. Als Längenstandard wurden 10 µl λEco130-Verdau verwendet.

### 2.2.3 ISSR-Analyse

Die Durchführung der ISSR-Technik erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von RATNAPARKHE et al. (1998 a,b). Je ISSR-Reaktion wurde folgender Reaktionsansatz (Gesamtvolumen: 20 µl) unter ständiger Eiskühlung pipettiert:

**Tab. 8:** Zur ISSR-Reaktion eingesetzte Stoffmengen.

Reagenz	Konzentration der Stammlösung	Volumen je Reaktionsansatz	Endkonzentration
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>		8,84 µl	
PCR-Puffer	10x	2,00 µl	1x
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	4,00 µl	5,0 mM
dNTP-Mix	je 10 µM	0,20 µl	je 0,1 µM
Primer	5 µM	0,80 µl	0,2 µM
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	5 U/µl	0,16 µl	0,04 U/µl
genomische DNA	5 ng/µl	4,00 µl	20 ng/ 20 µl

Die DNA wurde in 0,2 ml Eppendorf-Gefäßen vorgelegt. Aus den weiteren Reagenzien wurde ein Mastermix hergestellt. Der Mastermix wurde kurz gemischt, abzentrifugiert und auf die DNA pipettiert. Für die PCR wurde ein PTC-200 Thermocycler (mit Deckelheizung) mit nebenstehender Programmierung verwendet (Tab. 9). Das Reaktionsprodukt wurde abzentrifugiert. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20° C. Zur Detektion der Fragmente wurden die Proben mit 5 µl Auftragepuffer (5x) gemischt. Je 25 µl wurden zur Gel-Elektrophorese verwendet (1%-Agarose-TAE-Gel, Stromstärke 70 V).

**Tab. 9:** Thermocycler-Programm zur ISSR-PCR.

Schritt	Dauer	Temperatur	
1	2 min	95° C	Denaturierung
2	30 sec	94° C	Denaturierung
3	30 sec	50° C	Annealing
4	2 min	72° C	Extension
5	10 min	72° C	
7	∞	4° C	

Schritt 2-4 wurde 35x wiederholt.

## 2.2.4 AFLP-Analyse

Zur Erzeugung von AFLPs wurde das EcoRI/MseI-Enzymsystem gewählt. Die Detektion der Proben geschah nicht-radioaktiv via Fluoreszenz-Farbstoffe.

### 2.2.4.1 Restriktion-Ligation

Der Reaktionsansatz wurde in 0,5 ml Eppendorf-Gefäßen unter ständiger Eiskühlung angesetzt. Je Ansatz wurden 5,5 µl genomische DNA (i.e. 200 ng) vorgelegt. Folgende Vormix-Lösungen wurden hergestellt:

**Tab. 10:** Zur AFLP-Reaktion eingesetzte Stoffmengen I: Enzym-Vormix.

Reagenz	Konzentration der Stammlösung	Volumen je Reaktionsansatz	Endkonzentration
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>		0,62 µl	
NaCl	0,5 M	0,10 µl	50 mM
BSA	1 µg/µl	0,05 µl	50 ng/µl
T <sub>4</sub> -DNA-Ligase-Puffer	10 x	0,10 µl	1x
<i>Mse</i> I	4 U/µl	0,25 µl	1 U / 11 µl
<i>Eco</i> RI	20 U/µl	0,25 µl	5 U / 11 µl
T <sub>4</sub> -DNA-Ligase	8 U/µl	0,13 µl	1 U / 11 µl

**Tab. 11:** Zur AFLP-Reaktion eingesetzte Stoffmengen II: Reaktions-Vormix.

Reagenz	Konzentration der Stammlösung	Volumen je Reaktionsansatz	Endkonzentration
NaCl	0,5 M	1,00 µl	50 mM
BSA	1 µg/µl	1,00 µl	50 ng/µl
<i>Mse</i> I-Adaptor-Paar	50 µM	1,00 µl	2,5 µM
<i>Eco</i> RI-Adaptor-Paar	5 µM	1,00 µl	0,25 µM

Beide Ansätze wurden gemischt und abzentrifugiert. Der Reaktions-Vormix wurde zu dem Enzym-Vormix pipettiert, gemischt und abzentrifugiert. Jeweils 5,5 µl des Gesamt-Vormixes wurden zu der vorgelegten DNA gegeben. Der Reaktionsansatz wurde gemischt, abzentrifugiert und 2 h bei 37° C im Hybaid Omnigene Thermocycler inkubiert. Anschließend wurde jede Probe mit 189 µl TE-Puffer (0,1x) aufgefüllt, gemischt und abzentrifugiert. Die Lagerung erfolgte bei -20° C.

Für die AFLP-Reaktion wurden folgende Adaptoren verwendet:

**EcoRI-Adaptor:**

5' -CTC GTA GAC TGC GTA CC  
CAT CTG ACG CAT GGT TAA-5'

**MseI-Adaptor:**

5' -GAC GAT GAG TCC TGA G  
TA CTC AGG ACT CAT-5'

#### 2.2.4.2 Präamplifikation

Zur präselektiven Amplifikation wurde unter ständiger Eiskühlung nachfolgender Reaktionsansatz pipettiert:



**Tab. 12:** Zur AFLP-Reaktion eingesetzte Stoffmengen III: Präselektive Amplifikation.

Reagenz	Konzentration der Stammlösung	Volumen je Reaktionsansatz	Endkonzentration
RL-Produkt		4,0 µl	
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>		12,5 µl	
PCR-Puffer	10x	2,0 µl	1x
dNTP-Mix	je 10 µM	0,4 µl	je 0,2 µM
Präselektive Primer-Paare	je 2,5 µM	1,0 µl	je 125 pM
Taq-DNA-Polymerase	5 U/µl	0,1 µl	0,5 U / 20 µl

Der Reaktionsansatz wurde gemischt und abzentrifugiert. Die PCR wurde in einem Perkin-Elmer PE 9600 Thermocycler mittels nebenstehendem Programm durchgeführt (Tab. 13). Das Reaktionsprodukt wurde abzentrifugiert. 10 µl des Reaktionsproduktes wurden mit 190 µl TE-Puffer (0,1x) verdünnt, gemischt und abzentrifugiert. Die Lagerung erfolgte bei 4° C. Die restlichen 10 µl des Reaktionsproduktes wurden mit 2 µl Auftragepuffer (5x) gemischt, abzentrifugiert und auf ein 1,5% Agarose-TAE-Gel aufgetragen. Die angelegte Spannung betrug 70 V.

**Tab. 13:** Thermocycler-Programm zur PCR für die AFLP-Präamplifikation.

Schritt	Dauer	Temperatur	
1	2 min	72° C	Denaturierung
2	1 sec	94° C	Denaturierung
3	30 sec	56° C	Annealing
4	2 min	72° C	Extension
5	30 min	60° C	
7	∞	4° C	

Schritt 2-4 wurde 20x wiederholt.

### 2.2.4.3 Selektive Hauptamplifikation

Für die selektive Hauptamplifikation wurde nachfolgender Reaktionsansatz unter ständiger Eiskühlung pipettiert:

**Tab. 14:** AFLP-Reaktion III: Zur Hauptamplifikation eingesetzte Stoffmengen.

Reagenz	Konzentration der Stammlösung	Volumen je Reaktionsansatz	Endkonzentration
Präamplifikat		3,0 µl	
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>		12,5 µl	
PCR-Puffer	10x	2,0 µl	1x
dNTP-Mix	je 10 µM	0,4 µl	je 0,2 µM
<i>Mse</i> I-Primer	5 µM	1,0 µl	250 pM
<i>Eco</i> RI-Primer	1 µM	1,0 µl	50 pM
Taq-DNA-Polymerase	5 U/µl	0,1 µl	0,5 U / 20 µl

Der Reaktionsansatz wurde gemischt und abzentrifugiert. Beide Primer wiesen drei variable Basen nach der komplementären Adaptorssequenz auf. Der EcoRI-Primer war mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, entweder 5-Carboxyfluorescein (5FAM), 6-Carboxy-2,7-Dimethoxy-4,5-Dichlorocarboxy-fluorescein (JOE) oder Tetramethyl-6-Carboxyrhodamin (TAMRA). Die PCR-Reaktion erfolgte in einem Perkin Elmer PE 9600 bei folgendem Programm:

**Tab. 15:** Thermocycler-Programm zur PCR für die Hauptamplifikation.

Schritt	Dauer	Temperatur	
1	2 min	95° C	Denaturierung
2	1 sec	94° C	Denaturierung I
3	30 sec	65-56° C	Annealing I (Touchdown-Annealing)
4	2 min	72° C	Extension I
5	1 sec	94° C	Denaturierung II
6	30 sec	56° C	Annealing II
7	2 min	72° C	Extension II
8	∞	4° C	

Schritt 2-4 wurde 9x wiederholt.  
Schritt 5-7 wurde 22x wiederholt.

Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20° C.

#### 2.2.4.4 Probendetektion

Die Detektion der Fragmente erfolgte in einem ABI 377 Prism Sequencer. Zur Auftrennung der Proben wurde ein 5%iges denaturierendes Polyacrylamid-Gel verwendet. Die Auftrennungsstrecke betrug 36 cm, die angelegte Spannung betrug 2500 V. Als interner Längenstandard wurde ein Genescan-500 ROX Standard verwendet, welcher ebenfalls mit einem Fluoreszenzfarbstoff (6-Carboxy-X-Rhodamin) markiert war. Durch Laserlicht wurden die Fluoreszenzfarbstoffe angeregt, die resultierende Fluoreszenz wurde mit einer CCD-Kamera aufgezeichnet. Die Datensammlung erfolgte in dem Softwareprogramm Genescan.

Jeweils drei, mit unterschiedlichen Farbstoffen markierte Amplifikationsprodukte wurden gemischt und zusammen mit dem internen Längenstandard ROX und einem Formamid/Dextranblue-Beladungspuffer in einer Gelspur aufgetrennt. Das Mischungsverhältnis war wie folgt: 0,5 µl der 5-FAM-Amplifikate, 0,6 µl der JOE-Amplifikate, 0,9 µl der TAMRA-Amplifikate, 0,15 µl Längenstandard ROX sowie 0,85 µl Beladungspuffer.

#### 2.2.4.5 Auswertung

Die Verarbeitung der Daten erfolgte in dem Programm Genotyper. Dabei wurden pro Primerkombination alle Linien ungeachtet des Gellaufes mit identischen Analyseparametern gleichzeitig analysiert. Die Elternsorten wurden zur Kontrolle der polymorphen Fragmente bei jedem Gellauf als Standard eingesetzt. Lediglich solche Fragmente wurden ausgewertet, welche sich in vier Wiederholungen zwischen den Eltern-Linien als polymorph erwiesen.

### 2.3 Fettsäure-Analyse

Bei beiden Populationen wurde die Fettsäure-Zusammensetzung im Leinsamen mittels Gaschromatographie (GC) analysiert. In allen Linien, welche zur Kartierung verwendet wurden, wurde der prozentuale (w/w) Gehalt an Palmitinsäure ( $C_{16:0}$ ), Stearinsäure ( $C_{18:0}$ ), Ölsäure ( $C_{18:1}$ ), Linolsäure ( $C_{18:2}$ ) sowie Linolensäure ( $C_{18:3}$ ) ermittelt. Es wurde der Gehalt der einzelnen Fettsäuren im ganzen, unbehandelten Samenkorn erhoben. Die Analyse der Population I [Szegedi62 x Atalante] sowie deren Elternlinien (= Analyse I) wurde von der Deutschen Saatveredelung (Zentrale: Weissenburger Straße 5, D-59557 Lippstadt) durchgeführt. Die Analyse der Population II [Viking x McGregor-E1747] sowie der Sorten Szegedi62, Atalante, McGregor-E1747 und Viking (= Analyse II) wurde von Herrn Dr. C. MÖLLERS, Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, Universität Göttingen durchgeführt.

Die Probenaufbereitung erfolgte bei beiden Populationen nach folgendem Protokoll; in Klammern sind jeweils die von der Universität Göttingen verwendeten Mengen angegeben. 200 mg (500 mg) Leinsamen wurde gemahlen und in ein 3 ml Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 1 ml (2 ml) einer Lösung aus 0,5 mol Na-Methylat / 1l Methanol wurden die Fettsäuren aus dem Samen extrahiert und für 20 min bei 20° C transmethyliert. Anschließend wurde die Lösung kurz durchmischt und nochmals 10 min inkubiert. Danach wurden 300 µl Iso-Octan sowie 100 µl (500 µl) NaHSO<sub>4</sub> (5% w/v) zugegeben und gut durchmischt. Nach 3 min Inkubation bei Raumtemperatur konnten 150 - 200 µl der oberen Phase abgenommen und zur gaschromatographischen Analyse eingesetzt werden. (Parameter für den Gaschromatograph: s. Anhang)

## 2.4 Datenverarbeitung und Auswertung

### 2.4.1 Diversitätsanalyse

Die RAPD-Bandenmuster wurden auf polymorphe Fragmente zwischen den zu analysierenden Kultursorten hin verglichen. Dabei wurde darauf geachtet, daß die RAPD-Primer Bandenmuster mit klar voneinander differenzierbaren Fragmenten amplifizierten. Zudem sollten die Bandenmuster der einzelnen Sorten stets die gleiche Intensität aufweisen. Eindeutige Polymorphismen wurden binär bonitiert (,1' = Fragment vorhanden, ,0' = Fragment fehlt). Die Nomenklatur der Polymorphismen erfolgte nach der Nummer des Herstellers, Roth. Detektierte ein Primer mehrere Polymorphismen, so erhielt der Markerlocus eine alphabetische Erweiterung in der Reihenfolge der abnehmenden Fragmentgröße. Mit in die Analyse einbezogen wurde als phänotypische Eigenschaft die Samenfarbe. Aufgrund identischer Blütenfarbe wurde dabei vorausgesetzt, daß die Samenfarbe nur durch die Ausprägung eines Genlocus, nämlich G, variiert wird. Eine gelbe Samenfarbe wurde als ,0', eine braune dagegen als ,1' bonitiert. Die Zusammenstellung der Datenmatrix erfolgte mit der Kalkulationssoftware Excel für Windows 95 Version 7.0a (Microsoft Corp.).

Die Berechnung der genetischen Distanz ( $GD_{DICE}$ ) zwischen jedem möglichen Paar der zu analysierenden Kultursorten erfolgte anhand der binären Datenmatrix nach der Methode von DICE (1945):

$$GD_{Dice} = 1 - \frac{2N_{11}}{2N_{11} + N_{10} + N_{01}} \quad [6]$$

Alle Distanzberechnungen erfolgten in der Statistiksoftware SPSS für Windows Version 9.0.1 (SPSS Inc.).

Beruhend auf den Distanzkoeffizienten wurde eine hierarchische agglomerative Clusteranalyse durchgeführt, um Beziehungen zwischen den Sorten zu analysieren. Die Berechnung der Cluster erfolgte nach der Average-Linkage-Methode. Zum Vergleich der Ergebnisse wurden die Cluster außerdem noch nach der Methode von Ward berechnet. Der Prozeß der Clusterbildung wurde in Form eines Dendrogramms dargestellt. Parallel dazu wurde anhand der Diversitätskoeffizienten-Matrix eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt. Die Konfiguration des abgeleiteten Stimulus wurde in einem zweidimensionalen euklidischen Distanzmodell wiedergegeben. Alle Berechnungen erfolgten in der Statistiksoftware SPSS für Windows Version 9.0.1 (SPSS Inc.).

### 2.4.2 Analyse der molekularen Marker auf gestörte Spaltung

Anhand der Daten zur Berechnung der Rekombinationsfrequenzen wurde ein  $\chi^2$ -Test durchgeführt, um zu ermitteln, inwieweit die beobachteten Häufigkeiten mit den theoretisch erwarteten übereinstimmen. Als Nullhypothese wird folgende Erwartung angenommen: Die Häufigkeitsverteilung der Klassen entspricht für RILs einer 1:1 Verteilung. Die Berechnung des  $\chi^2$ -Wertes erfolgte nach folgender Formel:

$$\chi^2 = \frac{(B_{\text{ElterA}} - \frac{B_{\text{gesamt}}}{2})^2}{\frac{B_{\text{gesamt}}}{2}} + \frac{(B_{\text{ElterB}} - \frac{B_{\text{gesamt}}}{2})^2}{\frac{B_{\text{gesamt}}}{2}} \quad [7]$$

$B_{\text{Elter A}}$  entspricht der Anzahl der Linien, welche bezüglich des beobachteten Merkmals identisch waren mit Elter A.  $B_{\text{Elter B}}$  entspricht der Anzahl der Linien, welche bezüglich des beobachteten Merkmals identisch waren mit Elter B.  $B_{\text{gesamt}}$  entspricht der Anzahl aller beobachteten Fälle ( $B_{\text{gesamt}} = B_{\text{Elter A}} + B_{\text{Elter B}}$ ). Bezüglich Population I entspricht Elter A Szegedi62 und Elter B Atalante. Bezüglich Population II entspricht Elter A Viking und Elter B McGregor-E1747.

### 2.4.3 Erstellung der Kopplungskarten

Zur Berechnung der Rekombinationsfrequenzen sowie der Kopplungsgruppen wurde das Computer-Programm Mapmaker/Exp V3.0 eingesetzt (LANDER et al. 1987).

Während der Berechnung wurde mit der „*error detection*“ Funktion (Befehl: „*error detection on*“) gearbeitet. Diese Funktion schließt Beobachtungen, welche durch Doppel-Crossover innerhalb sehr kleiner Distanzen verursacht werden, von den Berechnungen aus (LINCOLN UND LANDER 1992). Alle Kopplungsabstände wurden nach der Formel von KOSAMBI (1944) berechnet. Zuerst wurde anhand aller Daten eine Zweipunkt-Analyse durchgeführt (Befehl: „*two point*“). Für alle möglichen Marker-Paarungen wurde der LOD-Wert (i.e. der dekadische Logarithmus des Quotienten aus der Likelihood bei Annahme des Kopplungsabstandes mit der größten Likelihood und der Likelihood bei Annahme einer freien Spaltung) und der Kopplungsabstand berechnet. Über einen Maximum-Likelihood-Ansatz wurde der Anteil der Rekombinanten ermittelt. Ausgehend von den Daten aus der Zweipunkt-Analyse wurde eine Gruppierung der Marker durchgeführt (Befehl: „*group*“). Als Mindestanforderung für eine Kopplung zwischen zwei Markern wurde ein LOD-Wert von 3,0 sowie ein maximaler Kopplungsabstand von 40,0 cM gewählt. Für alle Marker, die aufgrund der Zweipunkt-Analyse einer Kopplungsgruppe zugeordnet werden konnten, wurde eine

Dreipunkt-Analyse durchgeführt (Befehl: „*three point*“). Aufgrund dieser Daten wurde die wahrscheinlichste Reihenfolge der Marker nach der Maximum-Likelihood-Methode ermittelt (Befehl: „*compare*“). Für die bestmögliche Markerfolge wurden die Kopplungsabstände berechnet (Befehl: „*map*“).

Um diese Kopplungsgruppen zu verifizieren, wurde das Computer-Programm JoinMap V1.0 verwendet (STAM 1993). Als Datenbasis wurden die von Mapmaker/Exp V3.0 in der Zweipunkt-Analyse berechneten Marker-Gruppen verwendet. Als Grenzwert für eine Annahme der Kopplung zwischen zwei Markern wurden LOD-Werte von 3,0 („*linklod*“, zur Bildung von Kopplungsgruppen) und 0,05 („*maplod*“, zur Berechnung der Kopplungsabstände) gewählt. Als maximaler Kopplungsabstand für eine Kopplung zwischen zwei Markern wurden 40,0 cM gewählt. Auch bei diesem Programm wurden alle Kopplungsabstände nach KOSAMBI (1944) berechnet.

Die Kopplungsanalyse wurde für beide Populationen mit allen Markerdaten durchgeführt. Anhand von Markern, die in beiden Populationen polymorph waren, wurde ein Vergleich der Kopplungskarten vorgenommen. Für Kopplungsgruppen, auf denen mindestens zwei homologe Marker kartiert werden konnten, wurde eine Konsensus-Kopplungsgruppe anhand der Daten beider Populationen berechnet. Die Berechnung erfolgte in dem Programm JoinMap V1.0, wobei dieselben Parameter wie zur Berechnung der Populations-Kopplungskarten verwendet wurden. Um einen direkten Vergleich der Karten zu ermöglichen, wurden in dieser Arbeit ausschließlich die durch das Programm JoinMap berechneten Kopplungsabstände verwendet.

#### **2.4.4 Analyse der phänotypischen Variation innerhalb der Kartierungspopulation**

Via Gaschromatographie wurden die relativen Anteile an Palmitinsäure (C<sub>16:0</sub>), Stearinsäure C<sub>18:0</sub>), Ölsäure (C<sub>18:1</sub>), Linolsäure (C<sub>18:2</sub>) sowie Linolensäure (C<sub>18:3</sub>) im Leinsamen bestimmt.

Aus der Population I [Szegedi62 x Atalante] wurden 113 Linien kartiert. Aus diesen Linien wurden zufällig 81 Linien für die Fettsäureanalyse ausgewählt. Aus der Population II [Viking x McGregor-E1747] wurden 89 Linien kartiert. Von 87 dieser Linien wurde die Zusammensetzung des Fettsäuremusters mittels einer gaschromatographischen Analyse bestimmt.

Grundvoraussetzung für eine QTL-Berechnung ist eine Normalverteilung der zu untersuchenden Parameter in der Population. Dazu wurde für jeden Parameter ein Test

nach Kolmogoroff-Smirnow durchgeführt (z.B. ZÖFEL 1992). Außerdem wurde die Verteilung optisch über eine graphische Auftragung der Quantile der Verteilung der einzelnen Parameter auf die Quantile einer beliebigen Anzahl von den erwarteten Normalverteilungen geprüft. (Quantile sind Werte, welche die untersuchten Fälle in eine gewisse Anzahl gleichgroßer Klassen teilen.) Hierbei sollten sich im Falle einer Normalverteilung des untersuchten Parameters alle Datenpunkte auf einer Gerade anordnen.

#### 2.4.5 QTL-Berechnung

Zur Detektion von Loci, welche die Varianz im Fettsäure-Muster beeinflussen, wurde eine QTL-Berechnung mittels des Computer-Programms PLABQTL V1.0 (UTZ & MELCHINGER 1996) durchgeführt. Gleichzeitig konnten mit Hilfe dieses Programms detektierte QTLs auf den Kopplungskarten lokalisiert werden sowie die Größe ihres Einflusses geschätzt werden.

Die Kartierung der QTLs erfolgt im Zuge einer Intervall-Kartierung nach einem Maximum-Likelihood-Ansatz von LANDER & BOTSTEIN (1989). Zusätzlich wurde mit den flankierenden Markern eine multiple Regression nach dem Ansatz von HALEY & KNOTT (1992) durchgeführt. Dadurch wird die Einbeziehung von anderen Markern als Cofaktoren zur QTL-Detektion möglich (*composite interval mapping*). Die Berechnung der Größe der Eigenschaften erfolgte nach dem Modell von ZENG (1994):

$$y_j = m + b^* x_{jl} + \sum_k b_k x_{jk} + \varepsilon_j \quad [8]$$

$y_j$  bezeichnet die Größe der Eigenschaft für Individuum  $j$ ,  $m$  den Mittelwert für die betrachtete Eigenschaft über die Population sowie  $b^*$  den Effekt des angenommenen QTLs für das Markerintervall  $(l, l+1)$ .  $x_{jl}^*$  ist eine Zufallsvariable, welche die Werte 1, 0 oder -1 in Abhängigkeit von dem Genotyp der flankierenden Marker  $l$  und  $l+1$  sowie der Position des betrachteten QTLs annimmt.  $b_k$  ist der Regressions-Koeffizient bezogen auf den Cofaktor  $k$ .  $x_{jk}$  ist eine Variable, welche die Werte 1, 0 oder -1 in Abhängigkeit zu dem Genotyp des Individuums  $j$  an dem Markerlocus  $k$  annimmt.  $\varepsilon_j$  stellt eine unabhängige Konstante dar. Die Auswahl der Marker, welche als Cofaktoren genutzt wurden, erfolgte anhand der Mittelwerte aus einer schrittweisen Regressionsanalyse. Die Signifikanz der QTL-Berechnung wird durch zwei Größen charakterisiert: Die statistische Güte eines QTL oder der Summe aller QTLs nimmt mit der Größe des LOD-Wertes zu, sinkt aber bei positiveren AIC-Werten (= Akaike's infor-



*mation criterion*). Eine detailliertere Beschreibung der mathematischen Funktionen von PLABQTL findet sich in UTZ & MELCHINGER (1995).

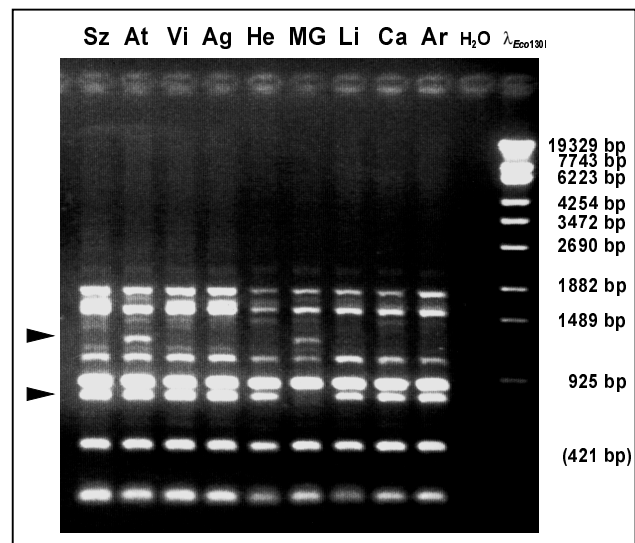
Als Kartierungsgrundlage wurden die in Joinmap berechneten Kopplungskarten genutzt. Die Verteilung der LOD-Werte für das Vorliegen eines QTLs bezüglich einer bestimmten Eigenschaft wurde für die gesamte Kopplungskarte berechnet. Zur Annahme eines QTLs wurde ein Schwellenwert von  $\text{LOD} \geq 3,0$  gesetzt. Nach LANDER & BOTSTEIN (1989) liegt die Signifikanzschwelle zur Detektion von QTLs in Kopplungskarten mit einem mittleren Markerabstand von 7 cM für Genome mit  $n = 15$  Chromosomen bei einem minimalen LOD-Wert von 2,8.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Diversitätsanalyse

Zur Bestimmung möglichst divergenter Kreuzungseltern wurde die genetische Distanz mehrerer Kultursorten von *Linum usitatissimum* L. ermittelt. Als Grundlage dafür dienten Polymorphismen, welche mit der RAPD-Methode erzeugt wurden (Abb.

5). 64 Primer (53,3%) eines 120 Primer umfassenden Satzes zufälliger Dekamerprimer erzeugten auswertbare Bandenmuster (Tab. 16). Primer mit 70% GC-Gehalt in ihrer Basensequenz amplifizierten häufiger klare Bandenmuster als solche mit 60 bzw. 80% GC-Gehalt in ihrer Sequenz (72,5% gegenüber 42,5% bzw. 45,0%). Die Bandenmuster umfaßten dabei zwischen 2 und 13 Fragmente im Bereich von 500 bis 2.500 bp. Primer mit 60% GC-Gehalt in ihrer Sequenz erzeugten durchschnittlich 6,2 Fragmente pro Primer. Mit zunehmendem GC-Gehalt nahm die Anzahl der amplifizierten Fragmente ab. Primer mit 80% GC-Gehalt erzeugten 5,4 Banden pro Primer. Insgesamt wurden 371 Fragmente analysiert.



**Abb. 5:** RAPD-Analyse von 9 Kulturleinsorten.

Sz = Szegedi62, At = Atalante, Vi = Viking, Ag = Argos, He = Hermes, MG = McGregor-E1747, Li = Linore, Ca = Cascade, Ar = Ariane, H<sub>2</sub>O = Kontrolle,  $\lambda_{Eco130I}$  = Größenstandard  
(1% Agarose-TBE-Gel, Primer 160.06)

Polymorphe Fragmente zwischen den Sorten traten bei 43 Primern (35,8%) auf. Insgesamt ließen sich 64 polymorphe Fragmente detektieren, bezüglich aller analysierten Fragmente resultiert daraus ein Polymorphiegrad von 17,3%. Primer, welche polymorphe Fragmente amplifizierten, traten am häufigsten in der Gruppe der Primer mit 70% GC-Gehalt auf. Hier erzeugte durchschnittlich jeder zweite Primer ein Bandenmuster mit mindestens einem polymorphen Fragment. Bei Primern mit 60 bzw.

**Tab. 16:** Ergebnisse der Analyse der genetischen Diversität mittels der RAPD-Technik.

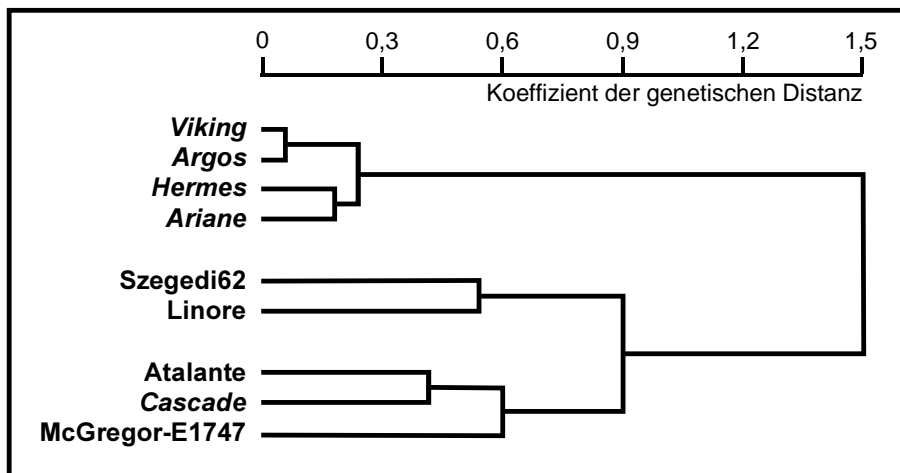
GC-Gehalt	60%	70%	80%
Primer mit auswertbaren Bandenmuster	17	29	18
Anteil an allen gescreenten Primern	42,5%	72,5%	45,0%
Banden (gesamt)	105	168	98
Banden/Primer	6,2	5,8	5,4
Primer, welche polymorphe Fragmente amplifizierten	11	20	12
Anteil an allen gescreenten Primern	27,5%	50,0%	30,0%
Polymorphe Fragmente (gesamt)	14	30	20
Polymorphe Fragmente/Primer	1,3	1,5	1,7

80% GC-Gehalt in der Sequenz erzeugten nur 27,5% bzw. 30,0% der Primer Polymorphismen. Allerdings nahm die Anzahl der polymorphen Fragmente pro Primer mit steigendem GC-Gehalt zu, nämlich von 1,3 bei Primern mit 60% GC-Gehalt auf 1,7 bei Primern mit 80% GC-Gehalt.

Primer mit höherem GC-Gehalt in ihrer Sequenz amplifizieren weniger Banden als solche mit niedrigerem GC-Gehalt, allerdings erweisen sich diese Fragmente häufiger als polymorph. Dagegen ist die Wahrscheinlichkeit Primer mit polymorphen Bandenmuster zu finden bei Primern mit 70% GC-Gehalt am größten.

Zusätzlich zu den 64 RAPD-Polymorphismen wurde noch ein phänotypisches Merkmal, nämlich die Ausprägung der Samenfarbe (gelb oder braun), mit in die Diversitätsanalyse einbezogen.

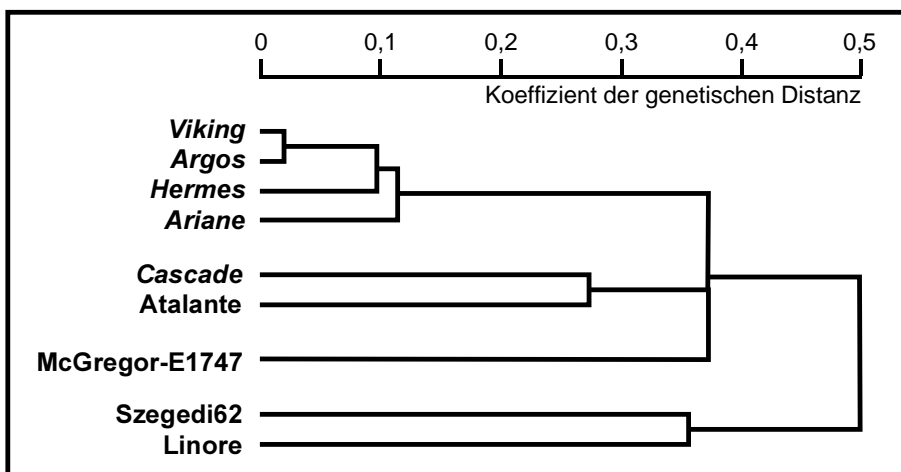
Anhand dieser Daten wurde eine Berechnung der genetischen Distanz durchgeführt. Eine Clusteranalyse nach WARD ergab auf der Ebene eines Distanzkoeffizienten von 0,6 eine Trennung in drei diskrete Gruppen (Abb. 6). Die erste Gruppe umfaßt die Faserleine Viking, Argos, Hermes und Ariane. Die zweite Gruppe besteht aus den Ölleinen Szegedi62 und Linore. Gruppe 3 schließt neben den Ölleinen Atalante und McGregor-E1747 auch den Faserlein Cascade ein.



**Abb. 6:** Clusteranalyse nach WARD.

Kursive Sortennamen kennzeichnen Faserlein-Sorten.

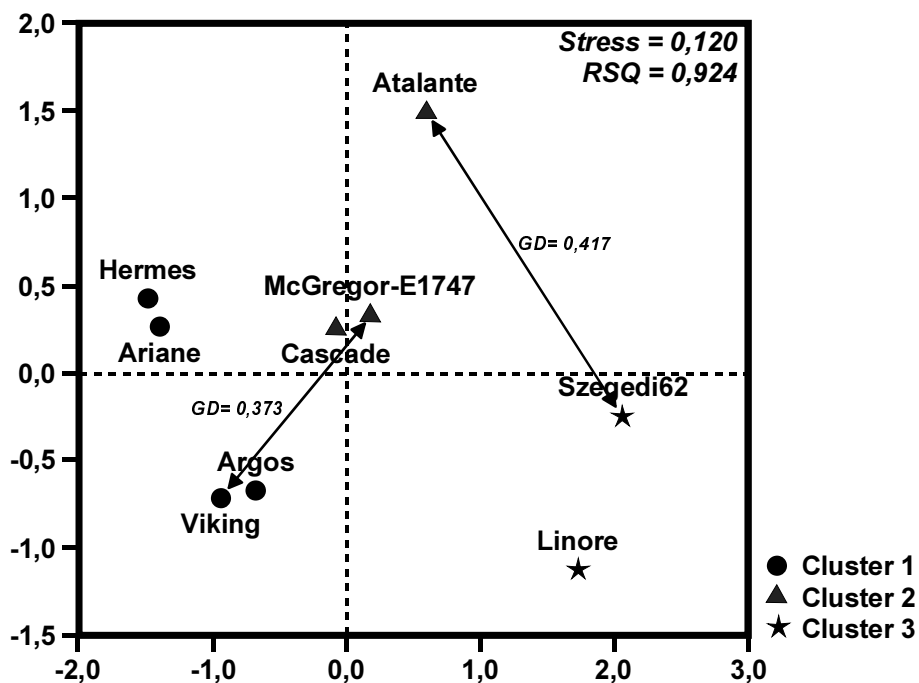
Zu ähnlichen Ergebnissen gelangt man, wenn die Clusteranalyse nach der Average-Linkage-Methode berechnet wird (Abb. 7). Auch hier finden sich die Faserleine Viking, Argos, Hermes und Ariane sowie die Ölleine Szegedi62 und Linore in zwei diskreten Gruppen. Allerdings findet man auf der Ebene eines Distanzkoeffizienten von 0,37 eine Trennung der EMS-Mutante McGregor-E1747 von den Sorten Atalante und Cascade.



**Abb. 7:** Clusteranalyse nach der Average-Linkage-Methode.

Kursive Sortennamen kennzeichnen Faserlein-Sorten.

Die unscharfe Zuordnung dieser Sorten wird bestätigt durch die zweidimensionale Darstellung der Ergebnisse aus den Distanzberechnungen, d.h. der Konfiguration des abgeleiteten Stimulus, im euklidischen Distanzmodell (Abb. 8). Die Sorten Cascade, McGregor-E1747 sowie Atalante finden sich zwischen den beiden Gruppen der Öl- bzw. Faserleinen, wobei die Diversität zwischen McGregor-E1747 real größer ausfällt als hier dargestellt. Der RSQ-Wert dieser multidimensionalen Skalierung beträgt 0,924, d.h. die Signifikanz der dargestellten Distanzen beträgt 92,4%.



**Abb. 8:** Konfiguration des abgeleiteten Stimulus im Euklidischen Distanzmodell.

Die Zuordnung der Sorten in einzelne Cluster erfolgte nach der 3-Cluster-Lösung auf der Ebene des Diversitätskoeffizienten von 0,6 nach der Clusterberechnung nach WARD. Die reale Distanz zwischen den Populationseletern ist als Unähnlichkeitsmaß GD an den Verbindungspfeilen eingezeichnet.

Die genetische Distanz als Unähnlichkeitsmaß nach DICE (GD) der Population I [Szegedi62 x Atalante] liegt bei 0,417, die der Population II [Viking x McGregor-E1747] bei 0,373.

## 3.2 Erstellung der Kopplungskarten

### 3.2.1 Population I [Szegegi62 x Atalante]

Anhand der Diversitätsanalyse wurden mehrere RAPD-Dekamerprimer ausgewählt, welche polymorphe Fragmente zwischen den Kreuzungseltern der Population I: Szegegi62 und Atalante amplifizierten (Übersicht s. Anhang). 19 Primer wurden zur Analyse von 113 zufällig ausgewählten Linien der F<sub>5</sub>-Generation verwendet. Die Primer erzeugten charakteristische Bandenmuster (*fingerprint*), welche jeweils zwischen drei und neun Fragmente zwischen 500 und 2.500 bp umfaßten. Von diesen erwiesen sich jeweils 1-2 Fragmente als polymorph zwischen den Kreuzungseltern. Insgesamt konnten 24 polymorphe RAPD-Markerloci detektiert werden (Tab. 17). Zur Unterscheidung der beiden Sorten waren Primer mit 80% GC-Gehalt in der Basensequenz am besten geeignet, durchschnittlich 22,2% der amplifizierten Fragmente erwiesen sich als polymorph. Betrachtet man die Gesamtzahl aller getesteten Primer, so fällt auf, daß nur 15,8% aller Zufalls-Dekamerprimer auswertbare polymorphe Fragmente amplifizierte.

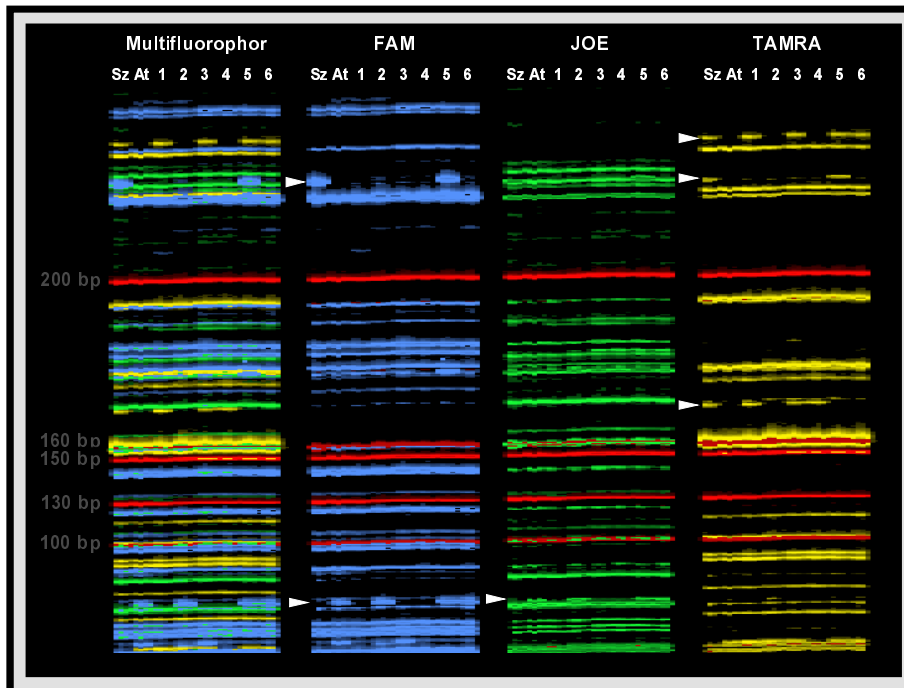
**Tab. 17:** Ergebnisse der RAPD-Analyse der Population I [Szegegi62 x Atalante].

GC-Gehalt	60%	70%	80%
Primer, welche polymorphe Fragmente amplifizierten	4	6	9
Amplifizierte Fragmente (gesamt)	23	39	54
Fragmente/Primer	5,8	6,5	6,0
Polymorphe Fragmente (gesamt)	4	8	12
Polymorphe Fragmente/Primer	1,0	1,3	1,3

Um die Anzahl an Polymorphismen zu erhöhen wurde zusätzlich eine AFLP-Analyse durchgeführt. Die Kreuzungseltern von Population I, Szegegi62 und Atalante, wurden mit 72 zufällig ausgewählten AFLP-Primer-Kombinationen analysiert (Abb. 9). Dabei wurden pro Primerkombination zwischen 75 und 150 Fragmente erzeugt. Die genaue Anzahl der detektierten Fragmente variiert mit der Einstellung der Empfindlichkeit der Auswertungssoftware sowie mit der Qualität der Nachweisreaktion. Im Unterschied zu konventionellen Markertechniken (RFLPs, RAPDs etc.) ist daher die genaue Anzahl der erzeugten Fragmente nicht eindeutig zu ermitteln.

Unter allen Primerkombinationen wurden solche Primerkombinationen ausgesucht, welche eine möglichst große Anzahl von deutlich erkennbaren, polymorphen Fragmenten erzeugten. Zudem wurde darauf geachtet, daß diese Primerkombinationen deutliche und klar differenzierte Bandenmuster erzeugten. Insgesamt 25 Primerkom-

binationen wurden schließlich zur Analyse der Rekombinationsereignisse anhand der schon für die RAPD-Analyse verwendeten 113 zufällig ausgewählten Linien der F<sub>5</sub>-Population herangezogen (Übersicht s. Anhang). Diese Primerkombinationen detektierten zusammen 124 Markerloci.



**Abb. 9:** AFLP-Gelbild.

Aufgetragen wurden je Block die Eltern der Population I, Szegedi62 (Sz) und Atalante (At), sowie 6 Linien der Population I (1-6).

Der linke Block zeigt die originäre, multifluorophore Detektion von 3 verschiedenen Primerkombinationen je Spur. In den weiteren Blöcken wurde jeweils nur eine einzige der drei Primerkombinationen detektiert. Die Markierung der Fragmente erfolgte je nach Primerkombination durch die Fluoreszenzfarbstoffe FAM (blau), JOE (grün) und TAMRA (gelb). Die Fragmente des internen Längenstandards ROX sowie die entsprechenden, absoluten Fragmentgrößen sind rot dargestellt. Weiße Pfeile zeigen polymorphe Fragmente zwischen den Kreuzungseltern und den Linien an.

Dieses Bild zeigt einen Ausschnitt im Bereich von ca. 60 bis 250 bp. Insgesamt können auf einem AFLP-Gel Fragmente im Bereich von ca. 50 bis 500 bp detektiert werden.

Mit 113 Linien wurde eine ISSR-Analyse durchgeführt. Von den 23 zur Evaluierung von Polymorphismen zwischen den Eltern-Linien eingesetzten Primern amplifizierten 15 Primer (65,2%) Fragmente (Übersicht s. Anhang), die restlichen Primer amplifizierten diffusen Schmier. Klar differenzierbare Fragmente lagen bei 11 Primern

(47,8%) vor. Von diesen Primern wurden insgesamt 60 Fragmente amplifiziert, durchschnittlich 5,5 Fragmente pro Primer. Fragmente, welche polymorph zwischen den Eltern waren, wurden von 2 Primern (UBC825 und UBC826) amplifiziert. Insgesamt konnten 4 Polymorphismen detektiert werden (6,7% aller detektierten Fragmente).

Die Auswertung der Daten erfolgte unter der Annahme eines dominant-rezessiven Vererbungsmechanismus für jeden Markerlocus. Jeder Markerlocus wurde in jeder Linie entweder als vorhanden oder abwesend detektiert und ausgewertet. Alle Daten wurden einem  $\chi^2$ -Test auf eine von der erwarteten 1:1 Verteilung abweichende Spaltung hin untersucht (Tab. 18). Für 35,9% aller erhobenen Markerdaten konnte die Annahme einer schiefen Spaltung bei einem Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,01$  nicht abgelehnt werden. Bezogen auf die zwei reziproken Kreuzungen finden sich jeweils etwas geringere Anteile von Marker mit gestörter Segregation (28,1% bzw. 22,9%). Insgesamt 19 Markerloci (15 AFLP-Loci und 4 RAPD-Loci) wiesen in beiden reziproken Teilpopulationen eine von der erwarteten Spaltung abweichende Verteilung auf. Zusätzlich zeigten in der Teilpopulation [Atalante x Szegedi62] weitere 24 Marker, nämlich 19 AFLP-Loci und 5 RAPD-Loci, eine gestörte Spaltung. In der Teilpopulation Szegedi62 x Atalante waren es weitere 19 Marker (18 AFLP-Loci, 1 phänotypischer Marker).

Bezogen auf die gesamte Population zeigten sich keine Unterschiede in der Häufigkeit eines Auftretens einer gestörten Segregation zwischen AFLP-Loci und RAPD-Loci. Durchschnittlich 37% beider Markertypen wiesen eine gestörte Segregation auf. Dagegen folgten alle 4 ISSR-Marker der erwarteten Spaltung.

**Tab. 18:** Test auf gestörte Spaltung.

	Detektiert	Gestörte Spaltung		
		Gesamte Population	Teilpop. At x Sz	Teilpop. Sz x At
<b>Markerloci gesamt</b>	153	55 (35,9%)	43 (28,1%)	38 (22,9 %)
<b>AFLP-Loci</b>	124	45 (36,3 %)	34 (27,4 %)	33 (26,6%)
<b>RAPD-Loci</b>	24	9 (37,5 %)	9 (37,5%)	4 (16,6%)
<b>ISSR-Loci</b>	4	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<b>Phänotyp</b>	1	1 (100 %)	0 (0%)	1 (100 %)

Signifikanzniveau  $\alpha = 0,01$ .



Der einzige phänotypische Marker, die Samenfarbe, spaltet in der gesamten Population nicht nach der erwarteten 1:1 Spaltung. Die gestörte Verteilung läßt sich nur in der Teilpopulation Szegedi62 x Atalante beobachten, in der reziproken Kreuzung tritt sie nicht auf.

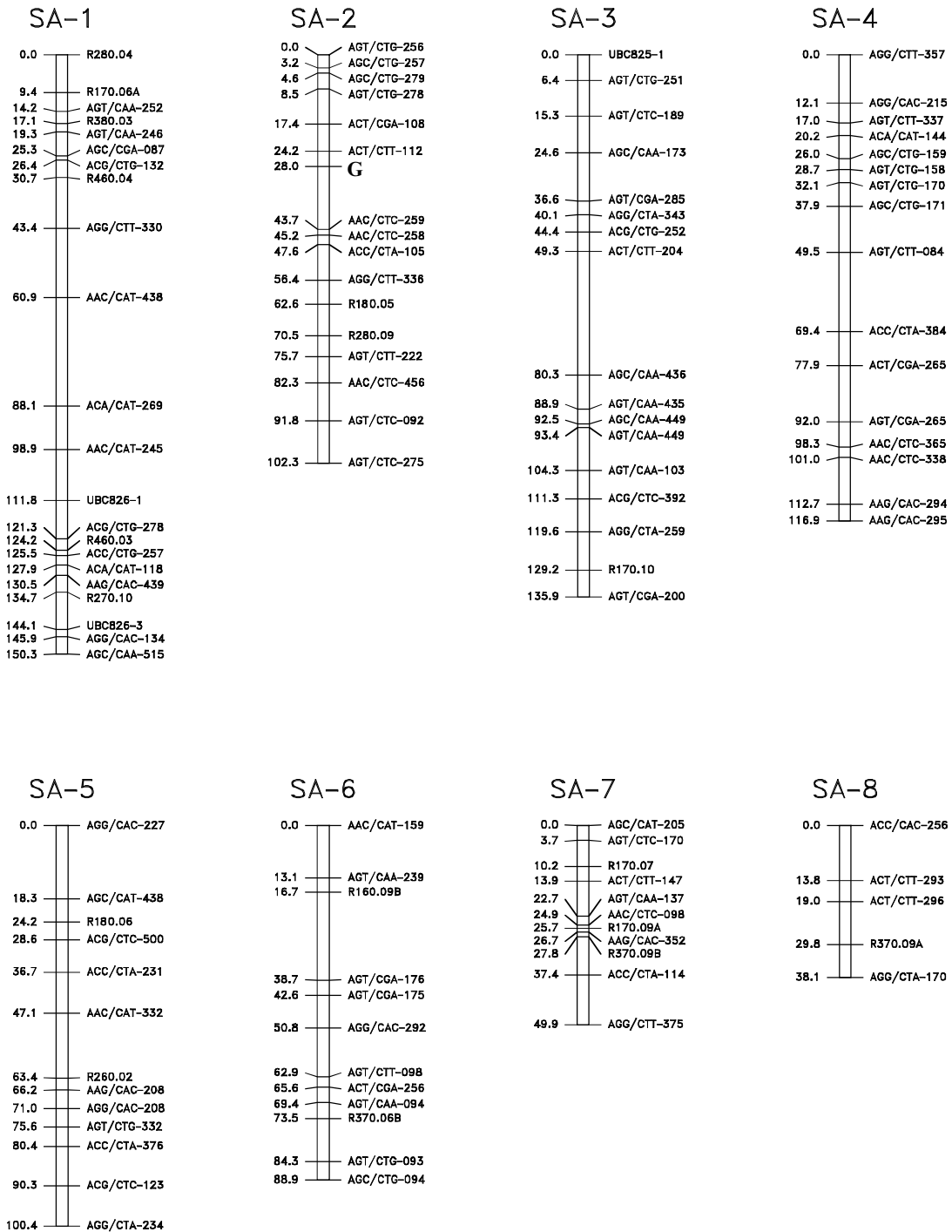
Die Berechnung aller Daten ergab für die Population I [Szegedi62 x Atalante] 16 Kopplungsgruppen (Tab. 19). Jede Kopplungsgruppe umfaßt dabei zwischen 3 und 22 Markerloci. Insgesamt konnten 139 Markerloci kartiert werden. 14 Markerloci (9,2%) konnten keiner Kopplungsgruppe zugeordnet werden, dabei ließen sich Unterschiede in den einzelnen Markerklassen feststellen. Lediglich 8,1% aller AFLP-Marker konnten nicht kartiert werden. Von den RAPD-Markerloci konnten 12,5% und von den ISSR-Markerloci 25,0% keiner Kopplungsgruppe zugeordnet werden.

**Tab. 19:** Die Kopplungsgruppen der Population I [Szegedi62 x Atalante].

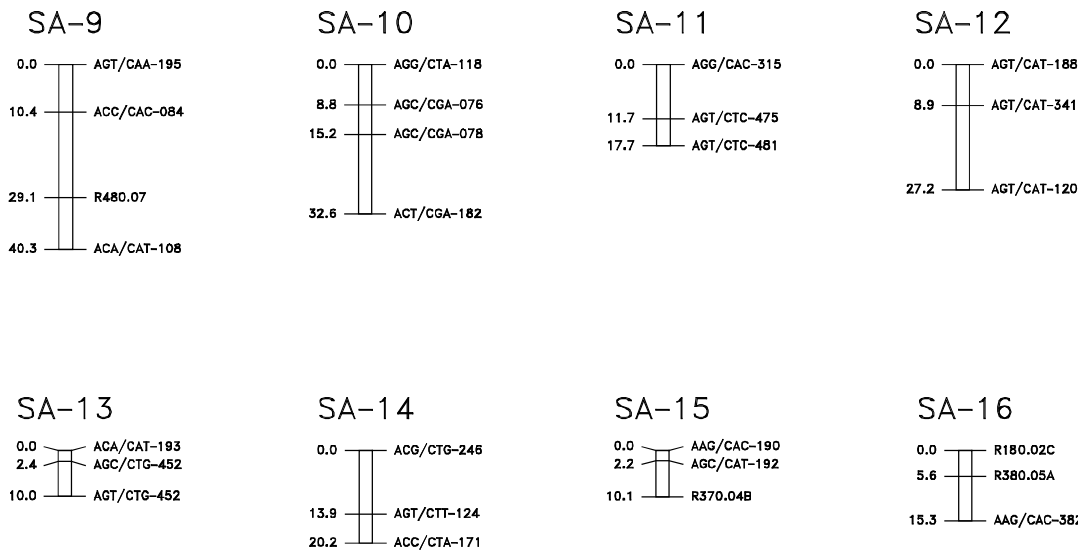
Kopplungsgruppe	Markerloci	Größe [cM]	Mittl. Markerabstand [cM/Marker]
SA-1	22	150,3	6,8
SA-2	17	102,3	6,0
SA-3	17	135,9	8,0
SA-4	16	116,9	7,3
SA-5	13	100,4	7,7
SA-6	12	88,9	7,4
SA-7	11	49,9	4,5
SA-8	5	38,1	7,6
SA-9	4	40,3	10,1
SA-10	4	32,6	8,2
SA-11	3	17,7	5,9
SA-12	3	27,2	9,1
SA-13	3	10,0	3,3
SA-14	3	20,2	6,7
SA-15	3	10,1	3,4
SA-16	3	15,3	5,1
<i>Gesamt</i>	<i>139</i>	<i>956,1</i>	<i>6,9</i>

Alle Kopplungsgruppen wurden für LOD-Werte über 3,0 berechnet.

Insgesamt umfaßt die Kopplungskarte 956,1 cM (Abb. 10 und 11). Die Größe der einzelnen Kopplungsgruppen variiert zwischen 150,3 cM und 10,1 cM. Der mittlere Kopplungsabstand zwischen den Markerloci beträgt 6,9 cM. Lediglich 3 Kopplungsabstände liegen über 20 cM (Kopplungsgruppe SA-1, SA-3, SA-6). Eine Clustering mehrerer Loci wurde nicht beobachtet.



Erläuterung siehe Seite 65.



**Abb. 10:** Kopplungskarte der Population I [Szedi62 x Atalante].

Die Kopplungsabstände sind in cM (Kosambi-Units) angegeben.

Nomenklatur der AFLP-Marker: [EcoRI-Primer] / [MseI-Primer] - [Fragmentgröße in bp].

Nomenklatur der RAPD-Marker: R [Primer-Nummer].

Nomenklatur der ISSR-Marker: UBC [Primer-Nummer] [Fragment-Nummer].

Auf Kopplungsgruppe SA-2 konnte der Locus G, welcher mitverantwortlich für die Ausbildung der Samenfarbe ist, kartiert werden. Dieser wird flankiert von den AFLP-Markerloci ACT/CTT-112 mit 3,8 cM Abstand und AAC/CTC-259 mit 15,7 cM Abstand zu G. Vier weitere Marker weisen einen Kopplungsabstand von weniger als 20 cM zu G auf: ACT/CGA-108 (10,6 cM), AGT/CTG-278 (19,5 cM), AAC/CTC-258 (17,2 cM) sowie ACC/CTA-105 (19,6 cM).

### 3.2.2 Population II [Viking x McGregor-E1747]

Die Kreuzungseltern der Population II, Viking und McGregor-E1747, wurden mit 113 AFLP-Primer-Kombinationen analysiert, um polymorphe Markerloci zwischen den Kreuzungseltern zu detektieren. Unter diesen befanden sich alle 25 AFLP-Primerkombinationen, welche zur Kartierung von Population I verwendet wurden. Insgesamt 26 Primer-Kombinationen wurden ausgewählt und damit die Rekombinationsfrequenzen von 89 zufällig selektierten Linien der insgesamt 176 Linien umfassenden Population bestimmt. Die Primerkombinationen wurden nach mehreren Kriterien ausgewählt: Zum einen wurden solche Primerkombinationen gewählt, die eine hohe Anzahl an deutlichen Polymorphismen zeigte. Zum anderen wurden alle Pri-

mer, die Markerloci detektierten, welche in beiden Populationen polymorph waren, ungeachtet der Gesamtzahl der polymorphen Loci, zur Analyse der Population II verwendet.

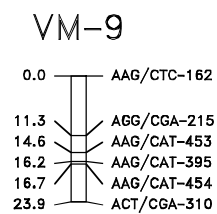
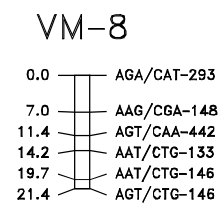
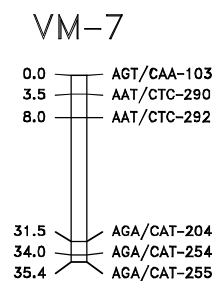
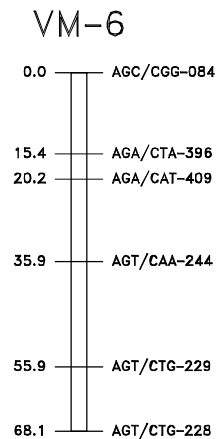
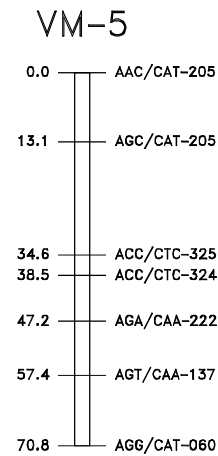
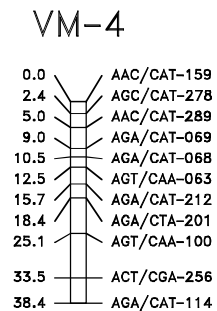
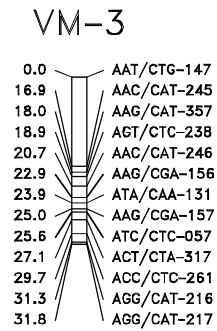
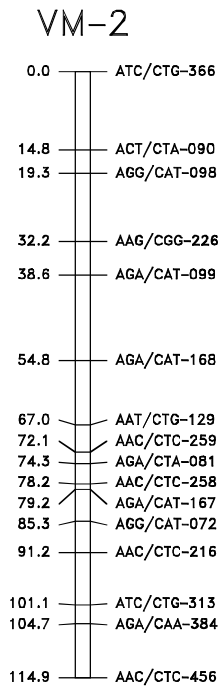
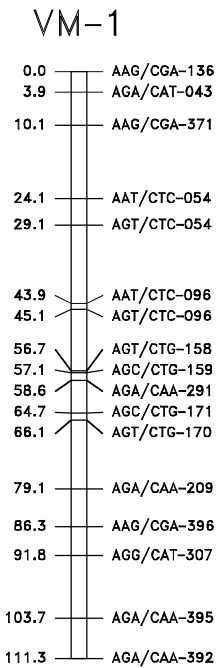
Insgesamt wurden 129 zwischen den Kreuzungseltern polymorphe Markerloci detektiert. Alle Marker wurden in einem  $\chi^2$ -Test auf eine eventuell von der erwarteten 1:1 Spaltung abweichende Verteilung hin untersucht. Für 29 (22,5%) Markerloci konnte die Annahme einer schiefen Spaltung bei einem Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,01$  nicht abgelehnt werden.

**Tab. 20:** Kopplungsgruppen der Population II [Viking x McGregor-E1747].

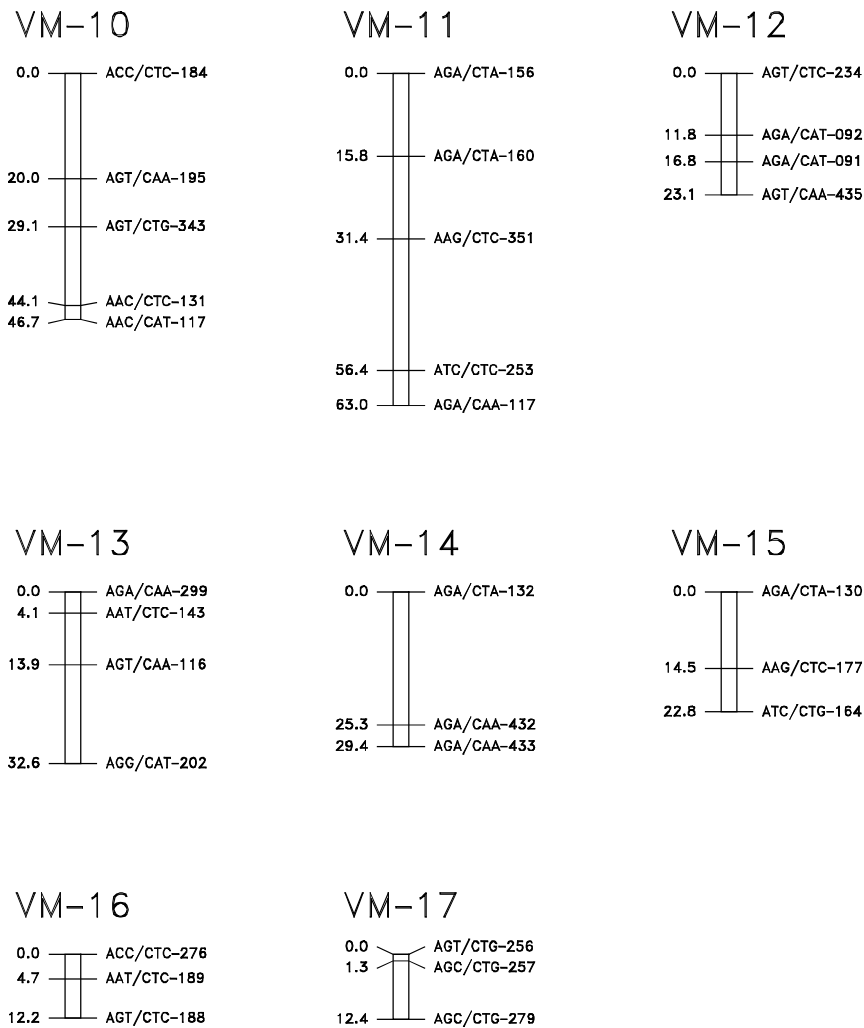
Kopplungsgruppe	Markerloci	Größe [cM]	Mittl. Markerabstand [cM/Marker]	max. LOD
VM-1	17	111,3	6,5	3,7
VM-2	16	114,9	7,2	5,4
VM-3	13	31,8	2,4	4,4
VM-4	11	38,4	3,5	12,4
VM-5	7	70,8	10,1	3,9
VM-6	6	68,1	11,4	4,3
VM-7	6	35,4	5,9	(2,8)*
VM-8	6	21,4	3,6	11,3
VM-9	6	23,9	4,0	6,9
VM-10	5	46,7	9,3	3,3
VM-11	5	63,0	12,6	(2,4)*
VM-12	4	23,1	5,8	7,3
VM-13	4	32,6	8,2	5,8
VM-14	3	29,4	9,8	3,1
VM-15	3	22,8	7,6	6,1
VM-16	3	12,2	4,1	10,1
VM-17	3	12,4	4,1	9,4
<i>Gesamt</i>	<i>118</i>	<i>758,2</i>	<i>6,4</i>	<i>102,6</i>

\*Durch Zuordnung einzelner ungekoppelter Markerloci resultierte ein LOD-Wert unter 3,0.

Eine Verrechnung aller Daten ergab 17 Kopplungsgruppen (Tab. 20, Abb. 11). Insgesamt ließen sich 118 Markerloci kartieren. 11 Markerloci (8,5%) wiesen keine Kopplung zu anderen Markerloci auf. Bei diesen Markern handelte es sich ausnahmslos um Marker, welche eine 1:1-Verteilung aufwiesen. Die einzelnen Kopplungsgruppen umfaßten jeweils zwischen 3 und 17 Marker. Die Größe der Kopplungsgruppen beträgt zwischen 12,4 und 114,9 cM. Insgesamt umfaßt die Kopplungskarte 758,2 cM. Der mittlere Abstand zwischen zwei Markerloci beträgt 6,4 cM. Lediglich drei Markerloci-Paare wiesen Abstände über 20 cM auf (Kopplungsgruppe



Erläuterung siehe Seite 68.



**Abb. 11:** Kopplungskarte der Population II [Viking x McGregor-E1747].

Die Kopplungsabstände sind in cM (Kosambi-Units) angegeben.

Nomenklatur der AFLP-Marker: [EcoRI-Primer] / [MseI-Primer] -  
[Fragmentgröße in bp].

VM-5, VM-11, VM-14). Alle Kopplungsgruppen konnten für LOD-Werte deutlich über 3,0 berechnet werden. Eine Ausnahme bilden VM-7 und VM-11. In VM-7 wurden 2 kleine Kopplungsgruppen mit LOD-Werten über 3,0 zusammengefügt, in VM-11 konnten bei Senkung des LOD-Wertes zwei bei LOD = 3,0 ungekoppelt gebliebene Marker kartiert werden. Eine Clusterung mehrerer Loci wurde nicht beobachtet.

### 3.2.3 Berechnung von Konsensus-Kopplungsgruppen

Alle 25 Primerkombinationen, welche zur Kartierung von Population I verwendet wurden, wurden auch auf Polymorphien zwischen den Eltern der Population II, Viking und McGregor-E1747, hin untersucht. Von 115 kartierten Markerloci erwiesen sich jedoch nur 19 (16,5%) als polymorph zwischen Viking und McGregor-E1747 (Tab. 21). Jeder Markerlocus konnte einer Kopplungsgruppe zugeordnet werden. Abb. 12 und 13 zeigen die Verteilung der homologen Marker in den beiden Populationen.

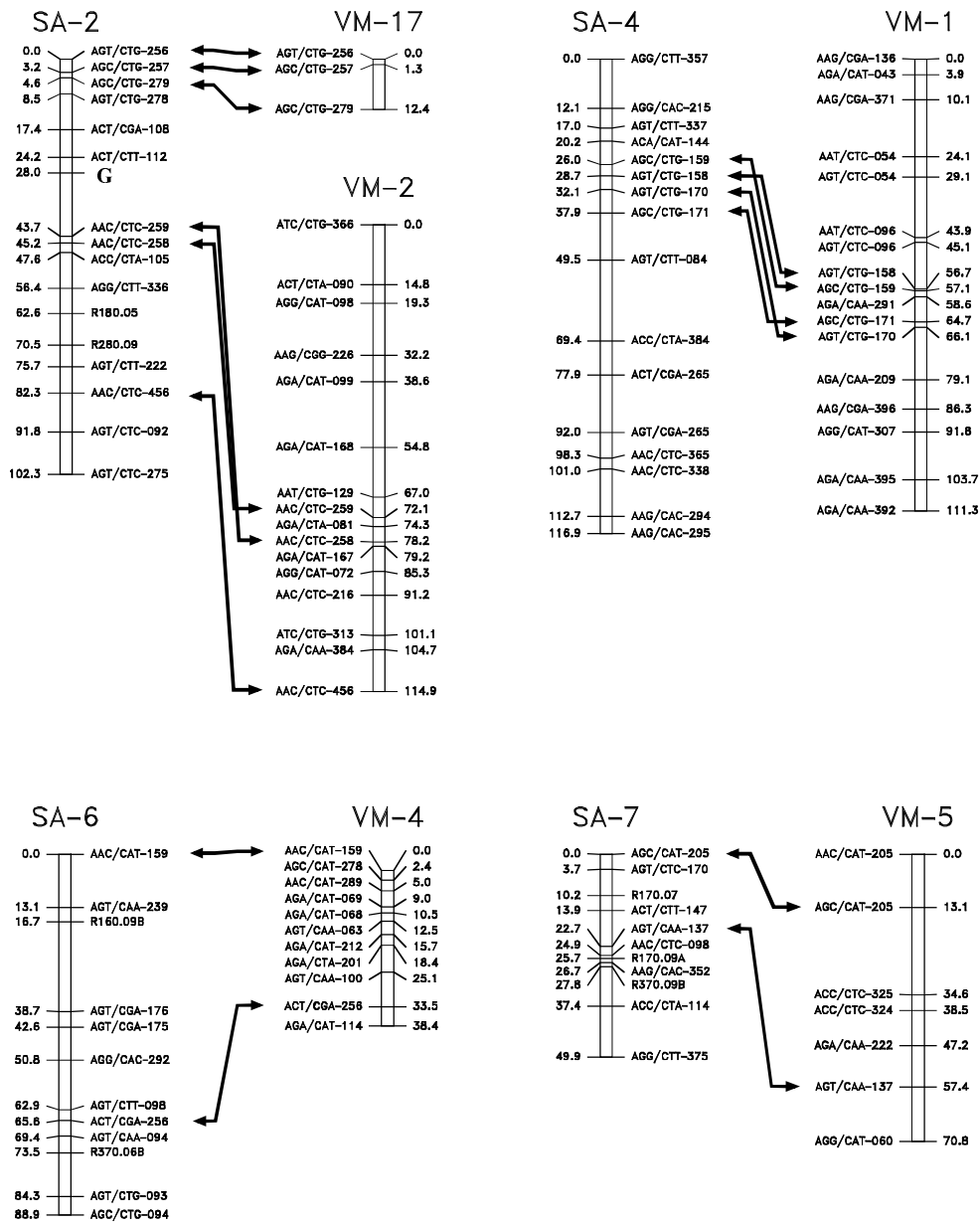
**Tab. 21:** Übertragbare Markerloci zwischen beiden Populationen.

Pop. I: Szegeedi62 x Atalante		Pop. II: Viking x McGregor	
Markerlocus	Kopplungsgruppe	Markerlocus	Kopplungsgruppe
AAC/CAT-245	SA-1	AAC/CAT-245	VM-3
AAC/CTC-258	SA-2	AAC/CTC-258	VM-2
AAC/CTC-259	SA-2	AAC/CTC-259	VM-2
AAC/CTC-456	SA-2	AAC/CTC-456	VM-2
AGC/CTG-257	SA-2	AGC/CTG-257	VM-17
AGC/CTG-279	SA-2	AGC/CTG-279	VM-17
AGT/CTG-256	SA-2	AGT/CTG-256	VM-17
AGT/CAA-103	SA-3	AGT/CAA-103	VM-7
AGT/CAA-435	SA-3	AGT/CAA-435	VM-12
AGT/CTC-189	SA-3	AGT/CTC-189	VM-16
AGC/CTG-159	SA-4	AGC/CTG-159	VM-1
AGC/CTG-171	Sa-4	AGC/CTG-171	VM-1
AGT/CTG-158	SA-4	AGT/CTG-158	VM-1
AGT/CTG-170	SA-4	AGT/CTG-170	VM-1
AAC/CAT-159	SA-6	AAC/CAT-159	VM-4
ACT/CGA-256	SA-6	ACT/CGA-256	VM-4
AGC/CAT-205	SA-7	AGC/CAT-205	VM-5
AGT/CAA-137	SA-7	AGT/CAA-137	VM-5
AGT/CAA-195	SA-9	AGT/CAA-195	VM-10

In Kopplungsgruppe SA-2 der Population I kartierten 6 Markerloci, welche ebenfalls in der Population II polymorph waren. In dieser kartierten 3 Markerloci in Kopplungsgruppe VM-2 und drei in der Kopplungsgruppe VM-17. Eine Kopplung untereinander ließ sich nicht feststellen.

Bei der Kopplungsgruppe SA-4 und VM-1 erwiesen sich 4 Markerloci als homolog. Jeweils zwei dieser Markerloci liegen in beiden Populationen relativ eng mitanander gekoppelt vor. Der Abstand AGC/CTG-159 AGT/CTG-158 beträgt in Population I 1,7 cM, in Population II 0,4 cM, der zwischen AGT/CTG-170 AGC/CTG-171 beträgt in Population I 5,8 cM, in Population II 1,4 cM. Im Verbund mit anderen Markerloci liegen diese Locipaare in beiden Populationen invers vor. Bei der Berechnung der Kon-

sensus-Kopplungsgruppe setzt sich allerdings die Reihenfolge, wie sie in Population I vorliegt, durch.

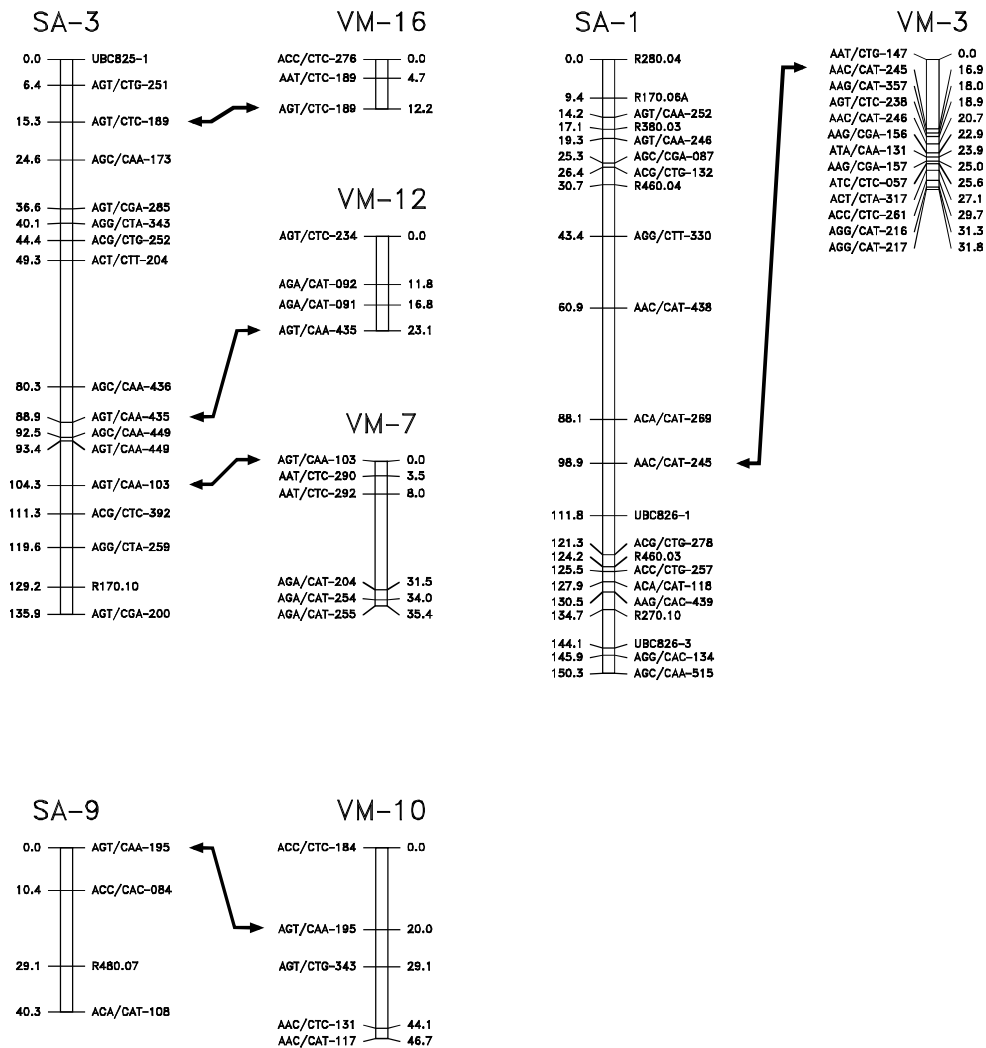


**Abb. 12:** Vergleich zwischen den Populationen von einzelnen Kopplungsgruppen mit mehr als einem homologen Markerlocus.

Desweiteren ließen sich zwischen den Kopplungsgruppen SA-6 und VM-4 zwei homologe Markerloci detektieren, ebenso wie zwischen den Kopplungsgruppen SA-7 und VM-5. Mehrere Kopplungsgruppen ließen sich über einen einzelnen homologen Marker einander zuordnen, so SA-1 zu VM-3 und SA-9 zu VM-10. In Kopplungsgrup-



pe SA-3 kartierten drei Markerloci, welche in drei kleineren Kopplungsgruppen der Population II kartierten.



**Abb. 13:** Vergleich zwischen den Populationen von einzelnen Kopplungsgruppen mit nur einem homologen Markerlocus.

Zur Berechnung einer gemeinsamen Kopplungsgruppe aus Kopplungsgruppen unterschiedlicher Populationen werden mindestens zwei Markerloci benötigt, die in beiden Populationen polymorph sind. Diese Bedingung wird für 4 Konsensus-Kopplungsgruppen erfüllt (Tab. 22). Die resultierende Konsensus-Kopplungskarte umfaßt 96 Marker. Insgesamt umfaßt diese Kopplungskarte 389,3 cM. Der mittlere Kopplungsabstand zwischen zwei Markerloci beträgt 4,1 cM. Alle Konsensus-Kopplungsgruppen konnten für LOD-Werte deutlich über 3,0 berechnet werden. Über

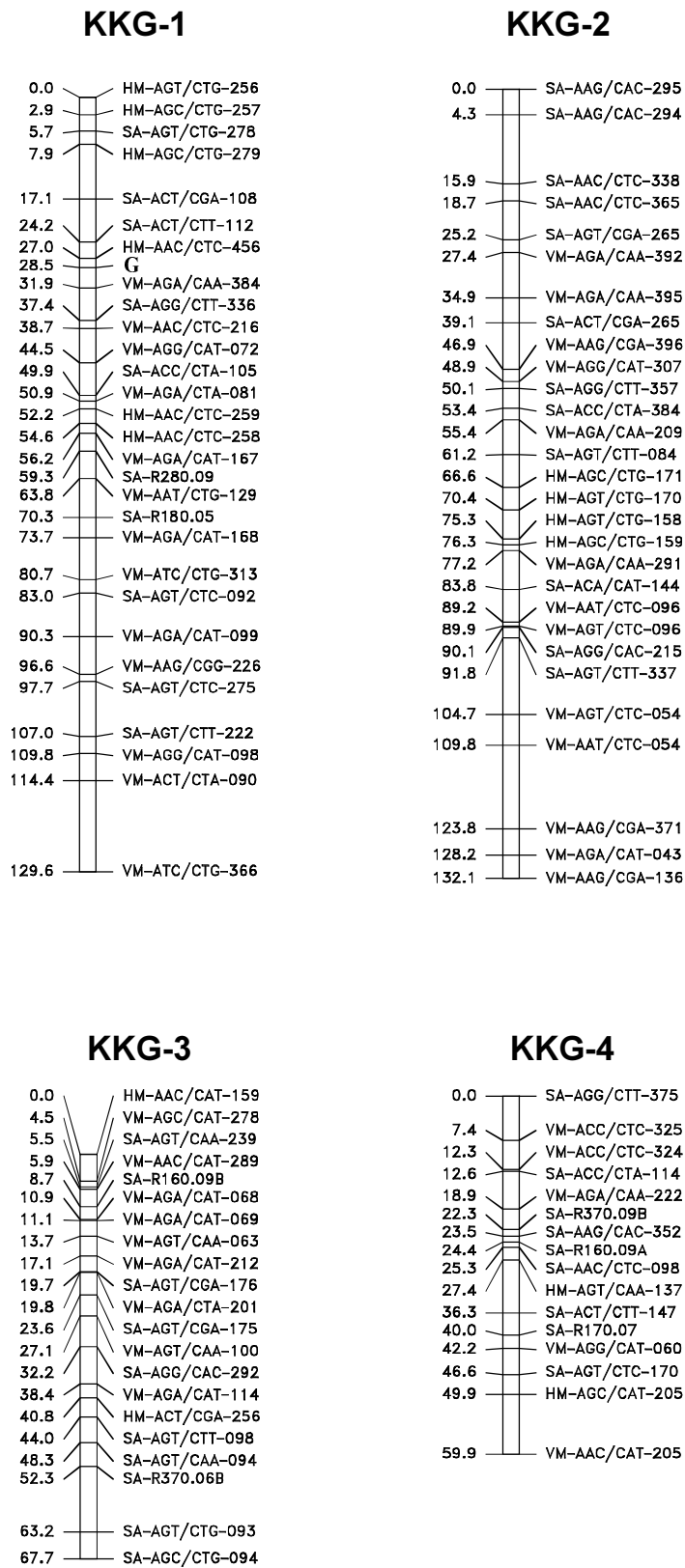
die Konsensus-Kopplungsgruppe I konnte die Verbindung zweier zuvor ungekoppelter Kopplungsgruppen (VM-2 und VM-17) der Population II erzielt werden.

In Abbildung 14 ist die resultierende Kopplungskarte abgebildet. Markerloci, welche polymorph in beiden Populationen sind, sind mit dem Zusatz HM-(*Markername*) bezeichnet. Markerloci, welche lediglich in einer Population polymorph sind, sind mit dem Zusatz SA-(*Markername*) (für Population I [Szegeđi62 x Atalante]) oder VM-(*Markername*) (für Population II [Viking x McGregor-E1747]) gekennzeichnet.

**Tab. 22:** Übersicht über die Konsensus-Kopplungsgruppen.

Kopplungsgruppe	KKG-1	KKG-2	KKG-3	KKG-4
Markerloci insgesamt	30	29	21	16
Markerloci von Population I	11	12	10	9
Markerloci von Population II	13	13	9	5
Gemeinsame Markerloci	6	4	2	2
Größe [cM]	129,6	132,1	67,7	59,9
mittlerer Kopplungsabstand [cM/Marker]	4,3	4,6	3,2	3,7

Die enge Kopplung des AFLP-Markerlocus' ACT/CTT-112 zu dem Genlocus G konnte bestätigt werden. In der Kartierung der Population I wies er eine Kopplung von 3,8 cM auf, in der Konsensuskarte beträgt die Kopplung 4,3 cM. Auch die anderen flankierenden Marker finden sich mit ähnlichem Abstand zu G in der Konsensus-Kopplungsgruppe. Allerdings änderte sich durch die Einbeziehung der Daten von der Population II die Reihenfolge der Marker leicht. So konnte für die Marker AAC/CTC-456 und AGG/CTT-336 ebenfalls eine enge Kopplung von 0,5 bzw. 9,1 cM zu Locus G ermittelt werden. Zusätzlich konnten die Markerloci VM-AGA/CAA-384, VM-AAC/CTC-216 und VM-AGG/CAT-072 der Population II mit Abständen von 3,4 cM, 10,2 cM und 16,0 cM zu Locus G kartiert werden.



**Abb. 14:** Konsensus-Kopplungskarte von 4 Kopplungsgruppen.

Erläuterung siehe Text.

### 3.3 Kartierung von polygenen Eigenschaften

#### 3.3.1 Population I [Szegedi62 x Atalante]

##### 3.3.1.1 Analyse der Elternlinien

Bei den Kreuzungseltern der Population I, Szegedi62 und Atalante, wurde die Zusammensetzung des Fettsäuremusters im Samenöl gaschromatographisch bestimmt (Tab. 23). Die beobachteten Merkmale waren dabei jeweils der relative Gehalt an den gesättigten Fettsäuren Palmitin- und Stearinsäure sowie an den ungesättigten Fettsäuren Ölsäure, Linolsäure und Linolensäure.

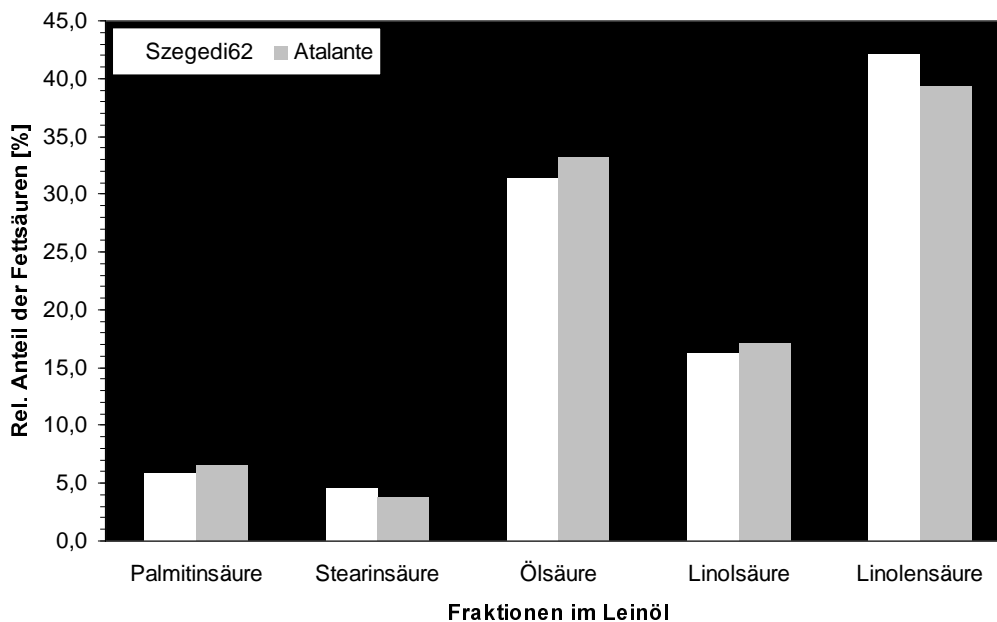
Ca.  $\frac{2}{5}$  des Leinöls besteht bei beiden Sorten aus Linolensäure (C<sub>18:3</sub>), ca.  $\frac{1}{3}$  aus Ölsäure (C<sub>18:1</sub>). Den kleinsten Anteil im Leinöl stellen die gesättigten Fettsäuren Stearinsäure (C<sub>18:0</sub>) und Palmitinsäure (C<sub>16:0</sub>), welche zusammen nur etwa 10% umfassen.

**Tab. 23:** Relative Anteile der Fettsäuren im Samenöl der Kreuzungseltern der Population I: Szegedi62 und Atalante.

	Szegedi62	Atalante	Δ	rel. Unterschied (At vs. Sz)
<b>Palmitinsäure</b>	5,84%	6,55%	0,71%	+ 12,2%
<b>Stearinsäure</b>	4,52%	3,84%	0,68%	- 15,0%
<b>Ölsäure</b>	31,36%	33,19%	1,83%	+ 5,8%
<b>Linolsäure</b>	16,16%	17,14%	0,98%	+ 6,1%
<b>Linolensäure</b>	42,12%	39,32%	2,80%	- 6,6%

„Δ“ beschreibt die absolute Differenz zwischen den beiden Kreuzungseltern. Der relative Unterschied zwischen beiden Sorten wurde bezüglich Szegedi62 bestimmt (Szegedi62 = 100%).

Zwischen Szegedi62 und Atalante treten bezüglich der einzelnen Fettsäure-Anteile Unterschiede auf. So enthält das Samenöl von Atalante höhere Anteile an Palmitinsäure, Ölsäure sowie Linolsäure (Abb. 15). Der relative Unterschied zwischen beiden Sorten liegt jeweils zwischen 5,8 und 15%.



**Abb. 15:** Vergleich der Fettsäurefraktionen im Leinöl von Szegedi62 und Atalante.

#### *Reproduzierbarkeit der gaschromatographischen Analyse*

Die gaschromatographischen Analysen wurden nach Populationen getrennt von zwei unterschiedlichen Laboren durchgeführt. Um die Übertragung der Ergebnisse zwischen den Populationen zu gewährleisten, wurde als Standard jeder Analysereihe die Elternlinien der Population I sowie laborinterne Standards mit analysiert. Die Ergebnisse des Elternvergleichs sind in Tabelle 24 wiedergegeben. Zwischen den Ein-

**Tab. 24:** Reproduzierbarkeit der gaschromatographischen Fettsäure-Analysen bei den Elternlinien der Population I: Szegedi62 und Atalante.

	Szegedi62			Atalante		
	Analyse 1	Analyse 2	Mittelwert	Analyse 1	Analyse 2	Mittelwert
<b>Palmitinsäure</b>	5,84%	6,1%	6,0%	6,55%	5,9%	6,2%
<b>Stearinsäure</b>	4,52%	4,5%	4,5%	3,84%	3,3%	3,6%
<b>Ölsäure</b>	31,36%	30,9%	31,1%	<b>33,19%</b>	<b>13,7%</b>	23,4%
<b>Linolsäure</b>	16,16%	14,5%	15,3%	17,14%	15,4%	16,3%
<b>Linolensäure</b>	42,12%	42,9%	42,5%	<b>39,32%</b>	<b>61,4%</b>	50,3%

Fettgedruckte Zahlen weisen auf unterschiedliche Meßergebnisse hin.

zelwerten bestehen nur geringe, unter Umständen auch von Umwelteinflüssen abhängige Unterschiede. Größere Unterschiede wurden nur bezüglich des Öl- und Linolensäuregehaltes bei dem Elter Atalante beobachtet. Der Wert von 61,4% für den relativen Gehalt an Linolensäure ist allerdings außergewöhnlich hoch, so daß in diesem Fall eventuell von einem Meßfehler auszugehen ist.

Die Vergleichbarkeit der Werte innerhalb einer Population bleibt von diesen Beobachtungen jedoch unberührt, da für Aussagen über die Häufigkeitsverteilung einzelner Parameter ausschließlich die Relation der Werte entscheidend ist. Da alle gaschromatographischen Analysen der Linien einer Population innerhalb einer Meßreihe durchgeführt wurden, sollten der experimentelle Fehler in allen Fällen gleich groß sein, so daß die einzelnen Meßergebnisse ohne Einschränkungen innerhalb der Population miteinander vergleichbar sind.

### 3.3.1.2 Spaltung innerhalb der Kartierungspopulation

Innerhalb der Kartierungspopulation I zeigte sich eine wesentlich größere Variation in den Fettsäure-Anteilen als in den Kreuzungseltern (Tab. 25).

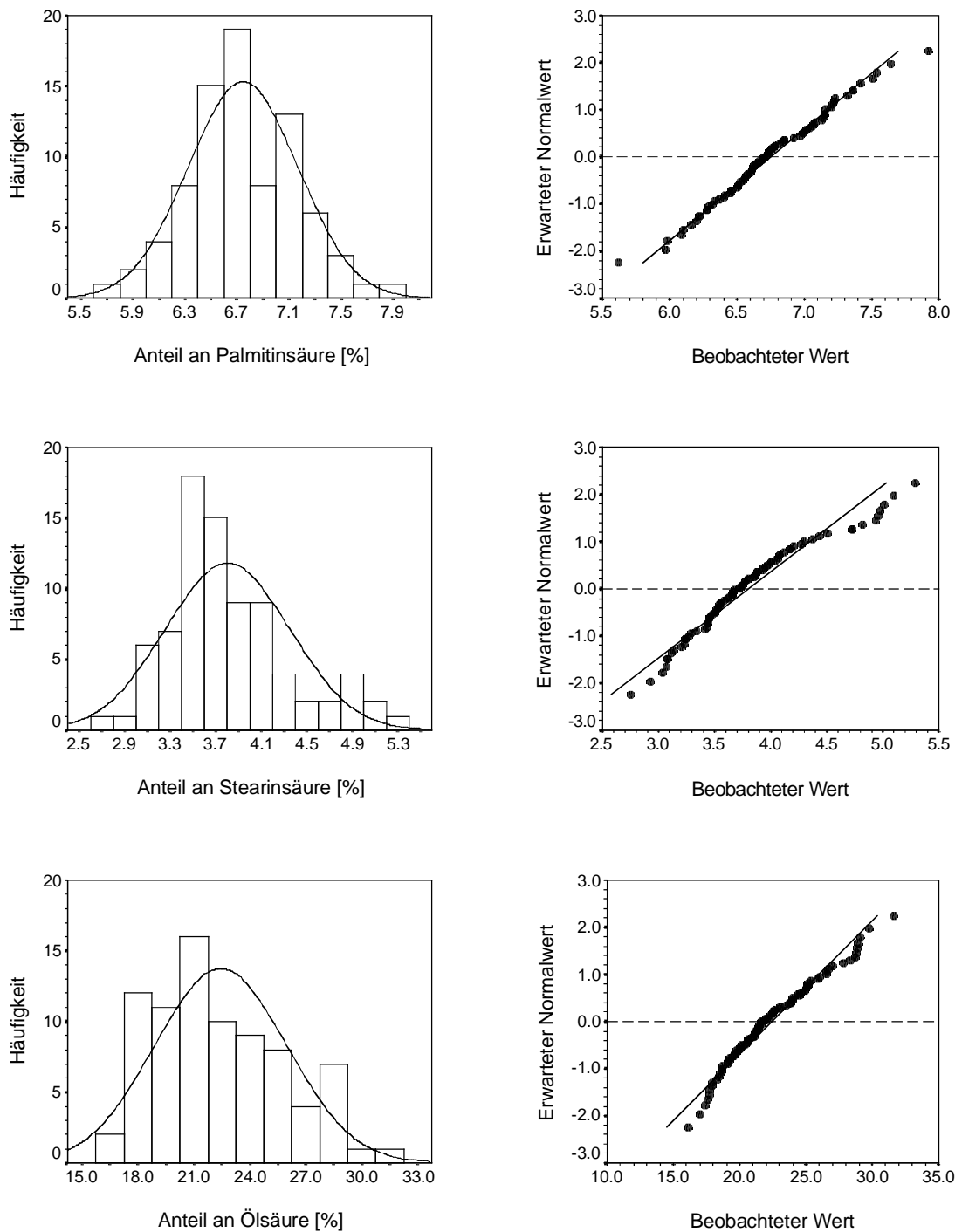
**Tab. 25:** Verteilung der Fettsäureanteile innerhalb der Population I [Szegedi62 x Atalante].

	Palmitinsäure	Stearinsäure	Ölsäure	Linolsäure	Linolensäure
<b>Mittelwert</b>	6,75%	3,80%	22,44%	15,38%	51,65%
<b>Standardabw.</b>	0,42%	0,55%	3,52%	1,57%	4,41%
<b>Minimum</b>	5,62% (L1890)	2,75% (L1865)	16,12% (L1751)	11,07% (L1773)	41,32% (L1938)
<b>Maximum</b>	7,92% (L1810)	5,29% (L1938)	31,61% (L1786)	18,54% (L1874)	59,22% (L1838)
$\Delta$	2,30%	2,54%	15,49%	7,47%	17,9%

Kursiv dargestellt sind die Nummern der RI-Linien mit den Extremwerten.

Der relative Ölsäure-Gehalt betrug im Minimum nur 51,0% des größten beobachteten Wertes. Ähnlich hoch fielen auch die Unterschiede im relativen Stearinsäure-Gehalt (52,0%) sowie im relativen Gehalt an Linolsäure (59,7%) aus. Auch bezüglich des relativen Gehaltes an Palmitin- und Linolensäure traten noch relativ hohe Differenzen auf. Hier betrug das Minimum 71,0% (Palmitinsäure) bzw. 69,8% (Linolensäure) des gemessenen Maximums.

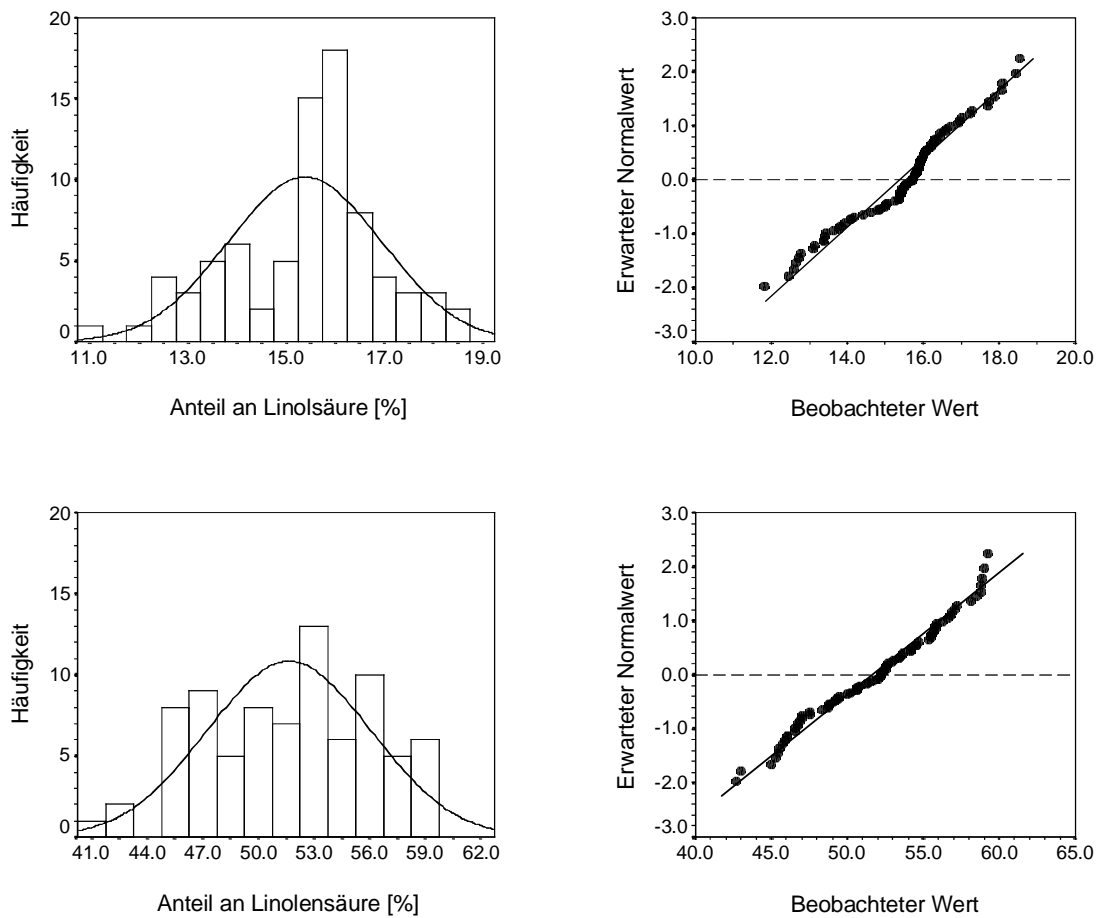
Für alle beobachteten Merkmale wurde geprüft, ob die einzelnen Merkmale innerhalb der untersuchten Population normalverteilt sind. Der Test auf Normalverteilung nach Kolmogoroff-Smirnov zeigte, daß für alle Merkmale eine Abweichung von der Normalverteilung auf einem Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,01$  ausgeschlossen werden konnte. Die Verteilung der Merkmale innerhalb der Kartierungspopulation ist in Abbildung 16 und 17 dargestellt. Zur Überprüfung der Normalverteilung wurden jeweils auch die zugehörigen Wahrscheinlichkeitsdiagramme (Q-Q-Diagramme) aufgeführt. Auch hier ist keine Abweichung von einer Normalverteilung feststellbar.



**Abb. 16:** Häufigkeitsverteilungen (*links*) und die dazugehörigen Wahrscheinlichkeitsdiagramme (*jeweils rechts daneben*) für die Merkmale „Relativer Gehalt von Palmitinsäure“, „Relativer Gehalt an Stearinsäure“ sowie „Relativer Gehalt an Ölsäure“

Bei der Häufigkeitsverteilung wurde neben der Verteilung der einzelnen Klassen auch die berechnete kontinuierliche Verteilung der einzelnen Fälle dargestellt. Im Wahrscheinlichkeitsdiagramm wurden die bei einer Normalverteilung erwarteten Werte (*Quantile*) gegen die beobachteten Werte (*Quantile*) aufgetragen. Die Gerade gibt die ideale Verteilung im Falle einer Normalverteilung wieder.





**Abb. 17:** Häufigkeitsverteilungen (*links*) und die dazugehörigen Wahrscheinlichkeitsdiagramme (*jeweils rechts daneben*) für die Merkmale „Relativer Gehalt an Linolsäure“ sowie „Relativer Gehalt an Linolensäure“.

(Erläuterung siehe Abb. 16).

### 3.3.1.3 Korrelation der Merkmale untereinander

Teilweise sind die relativen Gehalte einzelner Fettsäuren miteinander korreliert (Tab. 26). Völlig unabhängig voneinander ist lediglich der Gehalt an Linolsäure von den Gehalten an den Vorstufen Palmitin-, Stearin- und Ölsäure. Alle anderen Parameter weisen mehr oder weniger starke Korrelationen auf.

**Tab. 26:** Korrelationen der erhobenen Parameter für das Fettsäuremuster im Samenöl.

Fettsäure	Palmitinsäure	Stearinsäure	Ölsäure	Linolsäure
Palmitinsäure				
Stearinsäure	+0,494**			
Ölsäure	+0,280*	+0,454**		
Linolsäure	+0,079	-0,051	+0,089	
Linolensäure	-0,415*	-0,529**	-0,922**	-0,428*

\* Die Korrelation ist signifikant auf einem Niveau von  $\alpha = 0,05$ .

\*\* Die Korrelation ist signifikant auf einem Niveau von  $\alpha = 0,01$ .

Dargestellt sind die jeweiligen Korrelationskoeffizienten nach Pearson.

Anhand dieser Korrelationen läßt sich die Biosynthese der Fettsäuren gut nachverfolgen. Alle direkt aufeinanderfolgenden Syntheseprodukte weisen die stärkste Korrelation zueinander auf. So ist der Gehalt an Palmitinsäure ( $C_{16:0}$ ) korreliert mit dem Gehalt an Stearinsäure ( $C_{18:0}$ ) und dieser wiederum mit dem Gehalt an Ölsäure ( $C_{18:1}$ ). Die Synthese dieser Fettsäuren erfolgt unmittelbar aufeinander in den Plastiden (s. Abb. 2). Durch den Transport und die Zwischenspeicherung im Acyl-CoA-Pool wird jedoch die direkte Korrelation zwischen dem Gehalt an Ölsäure und dem nachfolgenden Produkt Linolsäure ( $C_{18:2}$ ) durchbrochen. Eine Korrelation besteht erst wieder zwischen dem Gehalt an Linolsäure und dessen Derivat Linolensäure ( $C_{18:3}$ ). Allerdings treten Korrelationen auch zwischen nicht unmittelbar aufeinanderfolgenden Syntheseprodukten auf, so z.B. zwischen dem relativen Gehalt an Stearinsäure und dem relativen Gehalt an Linolensäure.

### 3.3.1.4 Lokalisierung von QTLs für das Fettsäure-Muster im Samenöl

#### *Relativer Gehalt an Palmitinsäure ( $C_{16:0}$ ) im Samenöl*

Für das Merkmal „Relativer Gehalt an Palmitinsäure ( $C_{16:0}$ ) im Samenöl“ konnten bei einem LOD-Grenzwert von 3,0 insgesamt 10 QTLs lokalisiert werden (Tab. 27). Die einzelnen QTLs beschrieben zwischen 2,1 und 17,4% der beobachteten phänotypischen Varianz in der Population I. Insgesamt konnten 52,9 +/- 7,6% der phänotypischen Varianz mit diesen QTLs erklärt werden.

Der QTL  $C_{16:0-2}$  weist mit 10,07 einen deutlich höheren LOD-Wert als die übrigen QTLs auf. Gleichzeitig gehört er mit einem  $r^2$ -Wert von 16,4 zu den QTLs mit einem relativ großen Einfluß auf den Palmitinsäuregehalt im Leinöl. Der QTL  $C_{16:0-1}$  konnte

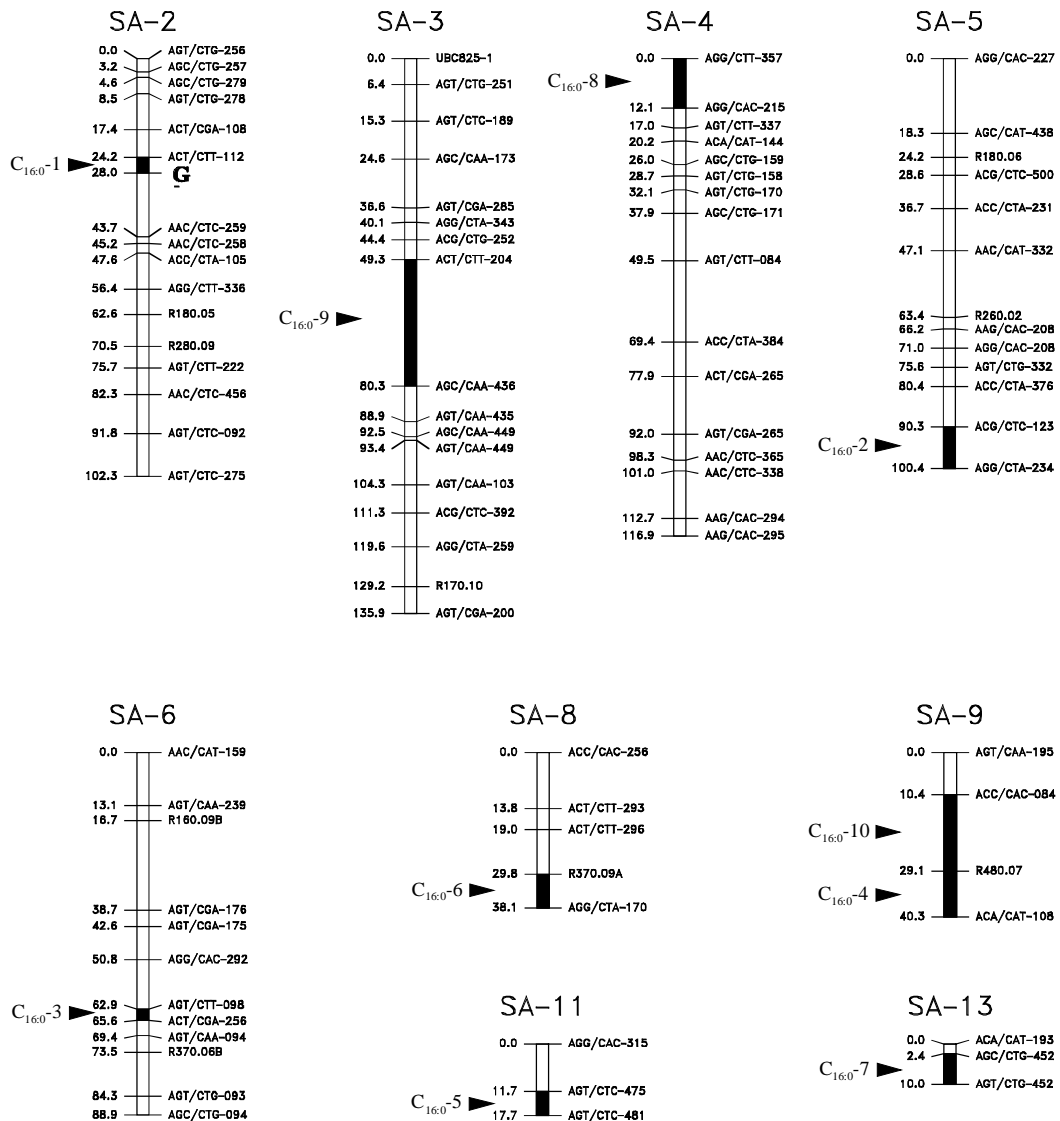
in unmittelbarer Nähe des Gens G, welches an der Ausprägung der Samenfarbe beteiligt ist, auf Kopplungsgruppe SA-2 lokalisiert werden.

Insgesamt konnten auf 9 der 16 Kopplungsgruppen QTLs kartiert werden (Abb. 18). Die einzelnen QTLs sind dabei relativ gleichmäßig verteilt. Auf Kopplungsgruppe SA-9 konnten zwei QTLs, C<sub>16:0</sub>-4 und C<sub>16:0</sub>-10, direkt nebeneinander lokalisiert werden. Diese zwei QTLs besitzen allerdings einen deutlich unterscheidbaren Effekt auf die Phänotypausprägung.

**Tab. 27:** Ergebnisse der Intervall-QTL-Lokalisierung für das Merkmal „Relativer Gehalt an Palmitinsäure (C<sub>16:0</sub>) im Samenöl“.

QTL	KG	Marker 1	Marker 2	LOD	r <sup>2</sup> [%]	Add. Effekt	AIC
C <sub>16:0</sub> -1	SA-2	ACT/CTT-112	<u>G</u>	4,09	17,4	+ 0,116	
C <sub>16:0</sub> -2	SA-5	ACG/CTC-123	AGG/CTA-234	10,07	16,4	+ 0,336	
C <sub>16:0</sub> -3	SA-6	AGT/CTT-098	ACT/CGA-256	3,39	16,2	- 0,144	
C <sub>16:0</sub> -4	SA-9	R480-07	ACA/CAT-108	4,08	12,7	+ 0,137	
C <sub>16:0</sub> -5	SA-11	AGT/CTC-475	AGT/CTC-481	3,17	11,1	+ 0,133	
C <sub>16:0</sub> -6	SA-8	R370-09A	AGG/CTA-170	3,14	9,3	- 0,102	
C <sub>16:0</sub> -7	SA-13	AGC/CTG-452	AGT/CTG-452	4,02	8,8	- 0,119	
C <sub>16:0</sub> -8	SA-4	AGG/CTT-357	AGG-CAC-215	6,30	6,6	+ 0,188	
C <sub>16:0</sub> -9	SA-3	ACT/CTT-204	AGC/CAA-436	4,05	2,6	+ 0,158	
C <sub>16:0</sub> -10	SA-9	ACC/CAC-084	R480-07	3,92	2,1	- 0,159	
<i>Gesamt</i>				13,22	52,9		-16,89

„QTL“ ist die Bezeichnung des detektierten QTL. „KG“ gibt an, auf welcher Kopplungsgruppe der jeweilige QTL lokalisiert wird. Die numerische Nomenklatur richtet sich nach der Größe des durch den QTL erklärten Anteil an der phänotypischen Varianz (*i.e.* Größe des r<sup>2</sup>). „Marker 1“ und „Marker 2“ flankieren das untersuchte Intervall. „LOD“ repräsentiert den LOD-Wert für den betreffenden QTL. „r<sup>2</sup>“ gibt den prozentualen Anteil der phänotypischen Varianz wieder, welcher durch die detektierten QTLs erklärt wird. „Add. Effekt“ gibt die Größe des additiven Effektes des detektierten QTLs an unter der Annahme, daß der Elter Atalante Träger der günstigeren Allele für das untersuchte Merkmal ist. Der „AIC“-Wert (= *Akaike's information criterion*) stellt eine Größe für die statistische Güte der QTL-Analyse dar.



**Abb. 18:** Lokalisierung der QTLs für das Merkmal „Relativer Gehalt an Palmitinsäure ( $C_{16:0}$ ) im Samenöl“.

Die Nummerierung der einzelnen QTLs erfolgte nach der Größe des  $r^2$ -Wertes.

### Relativer Gehalt an Stearinsäure ( $C_{18:0}$ ) im Samenöl

Für das Merkmal „Relativer Gehalt an Stearinsäure ( $C_{18:0}$ ) im Samenöl“ konnten bei einem LOD-Grenzwert von 3,0 keine QTLs berechnet werden. Auf der Kopplungsgruppe SA-1 (Markerintervall AAC/CAT-438 – ACA/CAT-269) und SA-2 (Markerintervall AAC/CTC-456 - AGT/CTC-092) treten allerdings zwei Maxima der LOD-Kurven auf, welche LOD-Werte von 2,34 bzw. 2,04 erreichen.

*Relativer Gehalt an Ölsäure (C<sub>18:1</sub>) im Samenöl*

Für das Merkmal „Relativer Gehalt an Ölsäure (C<sub>18:1</sub>) im Samenöl“ konnte bei einem LOD-Grenzwert von 3,0 ein QTL lokalisiert werden (Tab. 28). Der finale LOD nach der Regressionsanalyse dieses QTLs liegt mit 2,75 allerdings etwas unter diesem Grenzwert. Vor der Regressionsanalyse lag der LOD-Wert bei 3,70. Dennoch erklärt QTL C<sub>18:1</sub>-1 14,2 +/- 7,1% der phänotypischen Varianz. QTL C<sub>18:1</sub>-1 konnte in unmittelbarer Nähe zu dem Gen G auf der Kopplungsgruppe SA-2 lokalisiert werden.

**Tab. 28:** Ergebnisse der Intervall-QTL-Lokalisierung für das Merkmal „Relativer Gehalt an Ölsäure (C<sub>18:1</sub>) im Samenöl“.

QTL	KG	Marker 1	Marker 2	LOD	r <sup>2</sup> [%]	Add. Effekt	AIC
C <sub>18:1</sub> -1	SA-2	ACT/CTT-112	G	2,75*	14,1	+ 1,343	-8,66

\*Der LOD-Wert vor der finalen Regressionsanalyse liegt bei 3,70.  
Weitere Erläuterungen s. Tab. 27.

*Relativer Gehalt an Linolsäure (C<sub>18:2</sub>) im Samenöl*

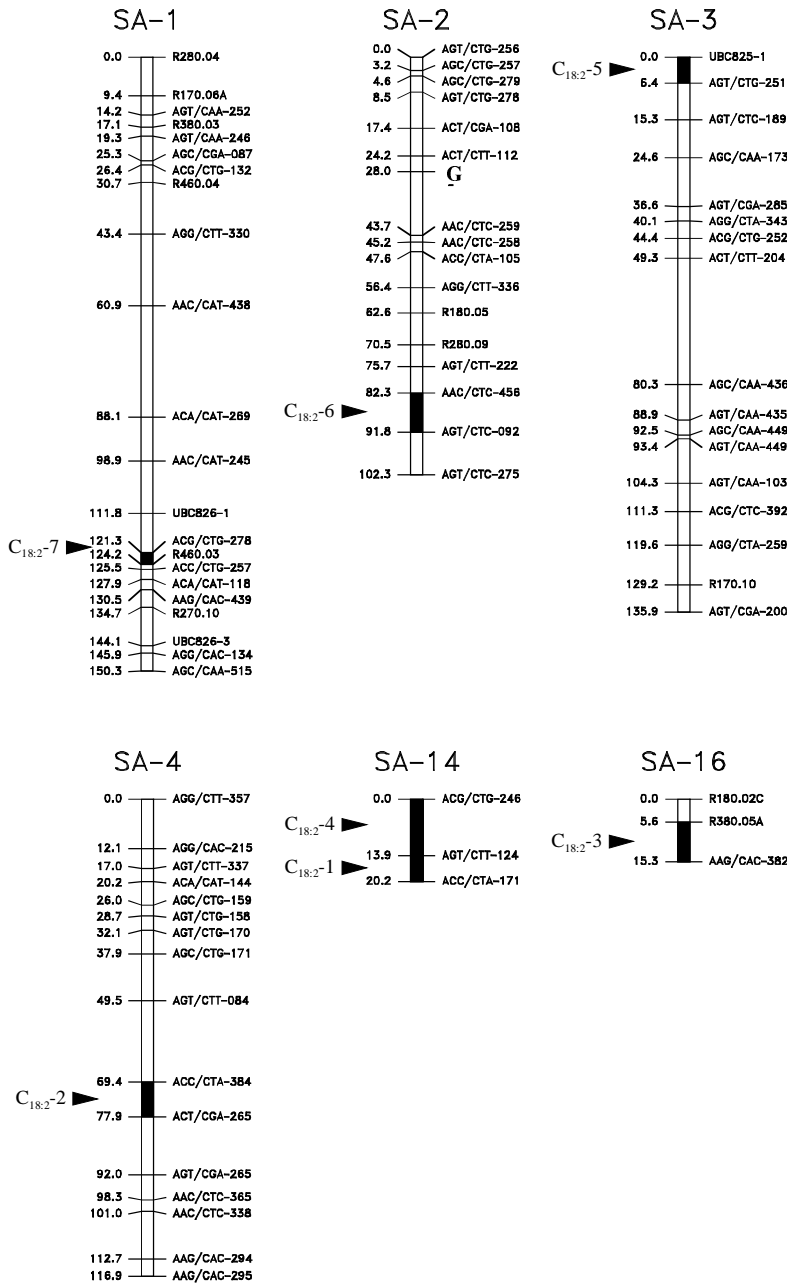
Für das Merkmal „Relativer Gehalt an Linolsäure (C<sub>18:2</sub>) im Samenöl“ konnten bei einem LOD-Grenzwert von 3,0 insgesamt 7 QTLs lokalisiert werden (Tab. 29). Sechs dieser QTLs (C<sub>18:2</sub>-2 bis 6) sind QTLs, welche über nur relativ wenig Einfluß auf die Varianz des Phänotyps verfügen. Sie erklären jeweils nur zwischen 1,1 und 5,8% der beobachteten Varianz. QTL C<sub>18:2</sub>-1 hat mit einem r<sup>2</sup>-Wert von 24,0% wesentlich größeren Anteil an der Phänotyp-Ausprägung. Dieser QTL zeichnet sich außerdem durch den größten LOD-Wert aus. Insgesamt erklären die lokalisierten QTLs 43,8 +/- 8,3% der phänotypischen Varianz.

**Tab. 29:** Ergebnisse der Intervall-QTL-Lokalisierung für das Merkmal „Relativer Gehalt an Linolsäure (C<sub>18:2</sub>) im Samenöl“.

QTL	KG	Marker 1	Marker 2	LOD	r <sup>2</sup> [%]	Add. Effekt	AIC
C <sub>18:2</sub> -1	SA-14	AGT/CTT-124	ACC/CTA-171	8,61	24,0	- 0,720	
C <sub>18:2</sub> -2	SA-4	ACC/CTA-384	ACT/CGA-265	3,75	5,8	- 0,522	
C <sub>18:2</sub> -3	SA-16	R380.05A	AAG/CAC-382	3,82	4,1	+ 0,668	
C <sub>18:2</sub> -4	SA-14	ACG/CTG-246	AGT/CTT-124	7,02	2,2	- 0,621	
C <sub>18:2</sub> -5	SA-3	UBC825T-1	AGT/CTG-251	5,85	2,1	+ 0,684	
C <sub>18:2</sub> -6	SA-2	AAC/CTC-456	AGT/CTC-092	3,43	1,6	- 0,618	
C <sub>18:2</sub> -7	SA-1	ACG/CTG-278	R460.03	3,07	1,1	- 0,650	
<i>Gesamt</i>				<i>10,01</i>	<i>43,8</i>		<i>-18,12</i>

Erläuterungen siehe Tab. 27.

Die 7 QTLs sind auf 6 Kopplungsgruppen verteilt (Abb. 19). QTL  $C_{18:2-1}$  und  $C_{18:2-4}$  wurden unmittelbar nebeneinander auf Kopplungsgruppe SA-14 lokalisiert. Die LOD-Kurve zeigt allerdings in diesem Bereich zwei diskrete Maxima, so daß hier auch zwei getrennte QTLs detektiert wurden.



**Abb. 19:** Lokalisierung der QTLs für das Merkmal „Relativer Gehalt an Linolsäure ( $C_{18:2}$ ) im Samenöl“.

### Relativer Gehalt an Linolensäure (C<sub>18:3</sub>) im Samenöl

Für das Merkmal „Relativer Gehalt an Linolensäure (C<sub>18:3</sub>) im Samenöl“ konnte bei einem LOD-Grenzwert von 3,0 ein QTL lokalisiert werden (Tab. 30). Dieser QTL erklärt bei einem LOD-Wert von 3,12 16,1 +/- 7,4 % der phänotypischen Varianz. QTL C<sub>18:3</sub>-1 konnte in Nähe der Gens G auf Kopplungsgruppe SA-2 kartiert werden.

**Tab. 30:** Ergebnisse der Intervall-QTL-Lokalisierung für das Merkmal „Relativer Gehalt an Linolensäure (C<sub>18:3</sub>) im Samenöl“.

QTL	KG	Marker 1	Marker 2	LOD	r <sup>2</sup> [%]	Add. Effekt	AIC
C <sub>18:3</sub> -1	SA-2	ACT/CTT-112	G	3,12*	16,1	- 1,685	-10,35

\* Der LOD-Wert vor der finalen Regressionsanalyse liegt bei 3,77. Weitere Erläuterungen siehe Tab. 27.

#### 3.3.1.5 Transgression

Als Transgression wird die Abweichung der Merkmalsausprägung bei den Nachkommen von der Merkmalsausprägung der Elterlinien bezüglich der Extremwerte bezeichnet. Die Transgression beschreibt also das Überschreiten der Merkmalsausprägung des Elters mit der höheren Merkmalsausprägung bzw. das Unterschreiten der Merkmalsausprägung des Elters mit der niedrigeren Merkmalsausprägung durch einzelne Linien der Nachkommenschaft. Die Transgressionseffekte werden in Tabelle 31 in den Vergleich mit den QTL-Effekten gestellt. Dabei wurden je nach Kombination der Allele der in der Intervall-Analyse lokalisierten QTLs entsprechende Klassen innerhalb der Nachkommenschaft gebildet und deren Merkmalsmittel bestimmt. Das jeweils größte und kleinste Merkmalsmittel ist den Merkmalsausprägungen der Eltern und der RI-Linien gegenübergestellt.

Bei allen Merkmalen konnte eine zum Teil erhebliche Transgression in den Linien der Nachkommenschaft beobachtet werden. Das Ausmaß der Transgression ist unabhängig von den Unterschieden zwischen den Elternlinien, wie z.B. die Ergebnisse für das Merkmal „Relativer Gehalt an Ölsäure im Samenöl“ zeigen. Für zwei Merkmale, nämlich „Relativer Gehalt an Linolsäure“ und „Relativer Gehalt an Linolensäure“, wurde eine Transgression auch für die durch die Kombination der detektierten QTLs gebildeten Klassen beobachtet. So wurde durch die beste QTL-Kombination ein nahezu 30% höherer Gehalt an Linolensäure im Samenöl detektiert.

**Tab. 31:** Merkmalsausprägungen der Kreuzungseltern sowie der RI-Linien der Population I [Szegedi62 x Atalante].

Merkmal	Eltern		Population			
	Szegedi62 [%]	Atalante [%]	Min <sub>RIL</sub> [%]	Max <sub>RIL</sub> [%]	Min <sub>QTL</sub> [%]	Max <sub>QTL</sub> [%]
Palmitinsäure	5,84	6,55	5,62	7,92	-*	5,95
Stearinsäure	4,52	3,84	2,75	5,29	-**	-**
Ölsäure	31,36	33,19	16,12	31,61	20,70	23,69
Linolsäure	16,16	17,14	11,07	18,54	14,31	16,24
Linolensäure	42,12	39,32	41,32	59,22	50,12	53,83

$Min_{RIL}$ ,  $Max_{RIL}$  = Minimale bzw. maximale Merkmalsausprägung bei den RI-Linien.

$Min_{QTL}$ ,  $Max_{QTL}$  = Mittlere minimale bzw. maximale Merkmalsausprägung bei den RI-Linien, welche die Allel-Kombination der in der Intervall-Analyse lokalisierten QTLs besitzen. Berücksichtigt wurden nur QTLs, die  $r^2$ -Werte über 10% aufwiesen.

\* Es wurden keine RI-Linien mit entsprechender Allel-Kombination gefunden.

\*\* Für das Merkmal „Relativer Gehalt an Stearinsäure im Samenöl“ wurden keine QTLs lokalisiert.

### 3.3.2 Population II [Viking x McGregor-E1747]

#### 3.3.2.1 Analyse der Elternlinien

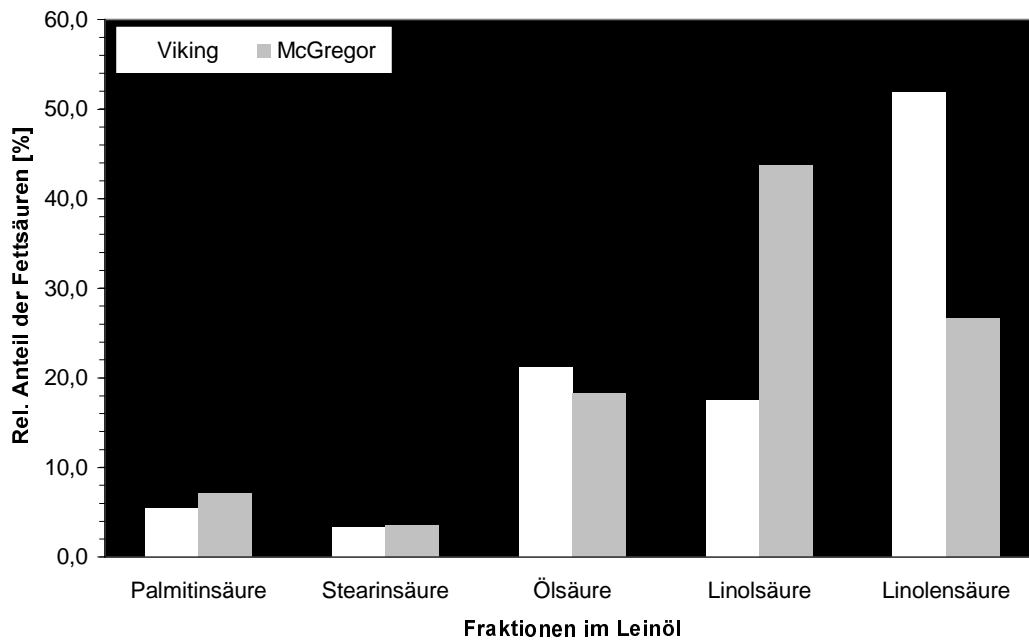
Bei den Kreuzungseltern der Population II, Viking und McGregor-E1747, wurde die Zusammensetzung des Fettsäuremusters im Samenöl gaschromatographisch bestimmt (Tab. 32). Die beobachteten Merkmale waren, wie bei der Population I auch, dabei jeweils der relative Gehalt an den gesättigten Fettsäuren Palmitin- und Stearinsäure sowie an den ungesättigten Fettsäuren Ölsäure, Linolsäure und Linolensäure.

**Tab. 32:** Anteile der Fettsäuren im Samenöl der Kreuzungseltern der Population II: Viking und McGregor-E1747.

	Viking	McGregor	$\Delta$	rel. Unterschied
Palmitinsäure	5,4%	7,1%	1,7%	+ 31,5%
Stearinsäure	3,3%	3,5%	0,2%	+ 6,1%
Ölsäure	21,2%	18,3%	2,9%	- 13,7%
Linolsäure	17,5%	43,7%	26,2%	+ 149,7%
Linolensäure	51,9%	26,6%	25,3%	- 48,7%

Der relative Unterschied zwischen beiden Sorten wurde bezüglich Viking bestimmt (Viking = 100%).





**Abb. 20:** Vergleich der Fettsäurefraktionen im Leinöl von Viking und McGregor-E1747.

Zwischen Viking und McGregor-E1747 treten bezüglich der einzelnen Fettsäure-Anteile zum Teil erhebliche Unterschiede auf (Abb. 20). Die größten Unterschiede zwischen beiden Sorten zeigen sich bezüglich der Anteile von Linol- und Linolensäure. So weist die Sorte McGregor-E1747 ca. 2½ mal höhere relative Anteile an Linolsäure im Samenöl auf. Dagegen weist diese Sorte einen wesentlich niedrigeren Anteil an Linolensäure auf: Dieser fällt nur etwa halb so hoch aus wie bei der Sorte Viking.

### 3.3.2.2 Spaltung innerhalb der Kartierungspopulation

In der Population II zeigte sich eine Variation bezüglich der einzelnen Fettsäure-Anteile von ähnlichem Umfang wie bei der Population I. Eine Ausnahme bildeten allerdings die relativen Anteile von Linol- und Linolensäure. In der Population II zeigten sich für diese Merkmale zwischen einzelnen Linien unterschiede von über 50% (Tab. 33).

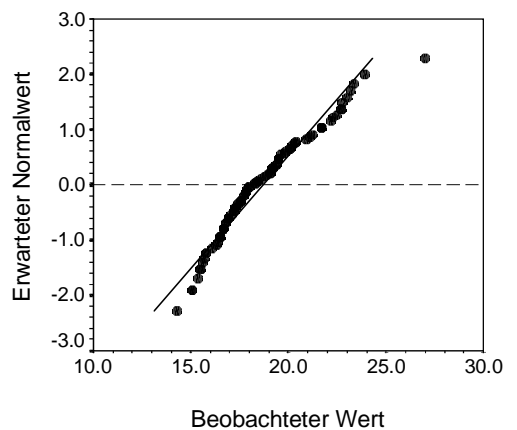
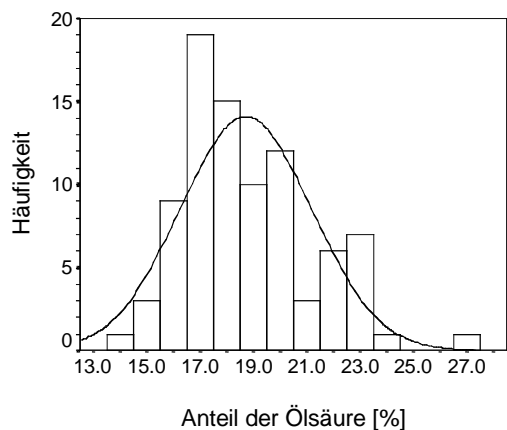
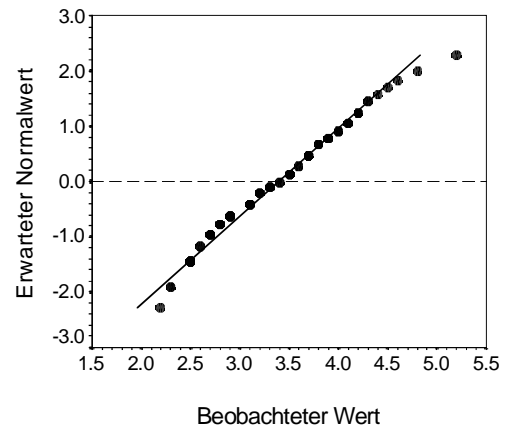
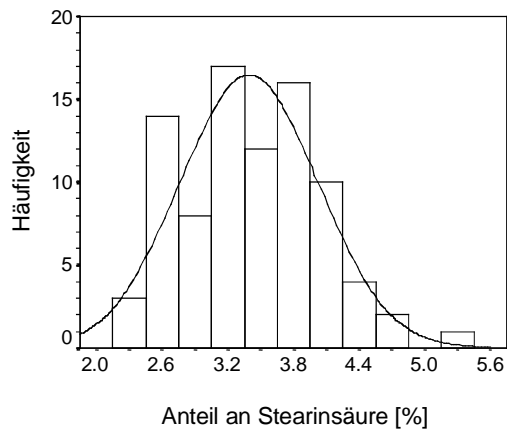
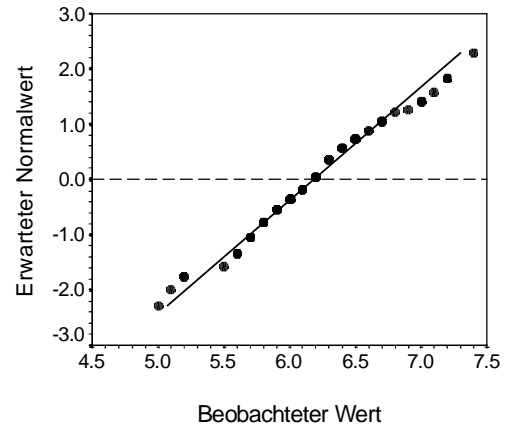
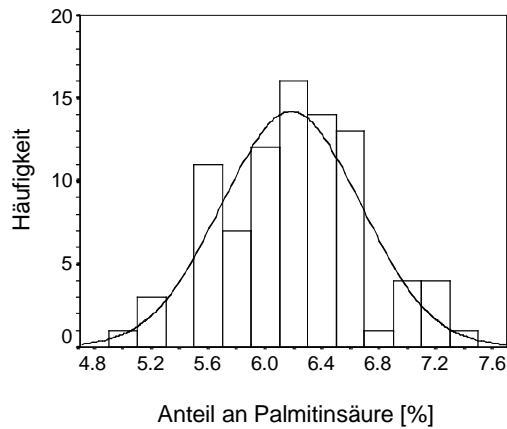
**Tab. 33:** Verteilung der Fettsäureanteile innerhalb der Population II [Viking x Mc-Gregor-E1747].

	<b>Palmitinsäure</b>	<b>Stearinsäure</b>	<b>Ölsäure</b>	<b>Linolsäure</b>	<b>Linolensäure</b>
<b>Mittelwert</b>	6,2%	3,4%	18,7%	38,0%	33,1%
<b>Standardabw.</b>	0,5%	0,6%	2,5%	15,2%	15,1%
<b>Minimum</b>	5,0%	2,2%	14,3%	17,3%	2,1%
	<i>(VM-094)</i>	<i>(VM-137)</i>	<i>(VM-164)</i>	<i>(VM-024)</i>	<i>(VM-005)</i>
<b>Maximum</b>	7,4%	5,2%	27,0%	70,7%	55,9%
	<i>(VM-127)</i>	<i>(VM-012)</i>	<i>(VM-063)</i>	<i>(VM-128)</i>	<i>(VM-017)</i>
$\Delta$	2,4%	3,0%	12,7%	53,4%	53,8%

Kursiv dargestellt sind die Nummern der RI-Linien mit den Extremwerten.

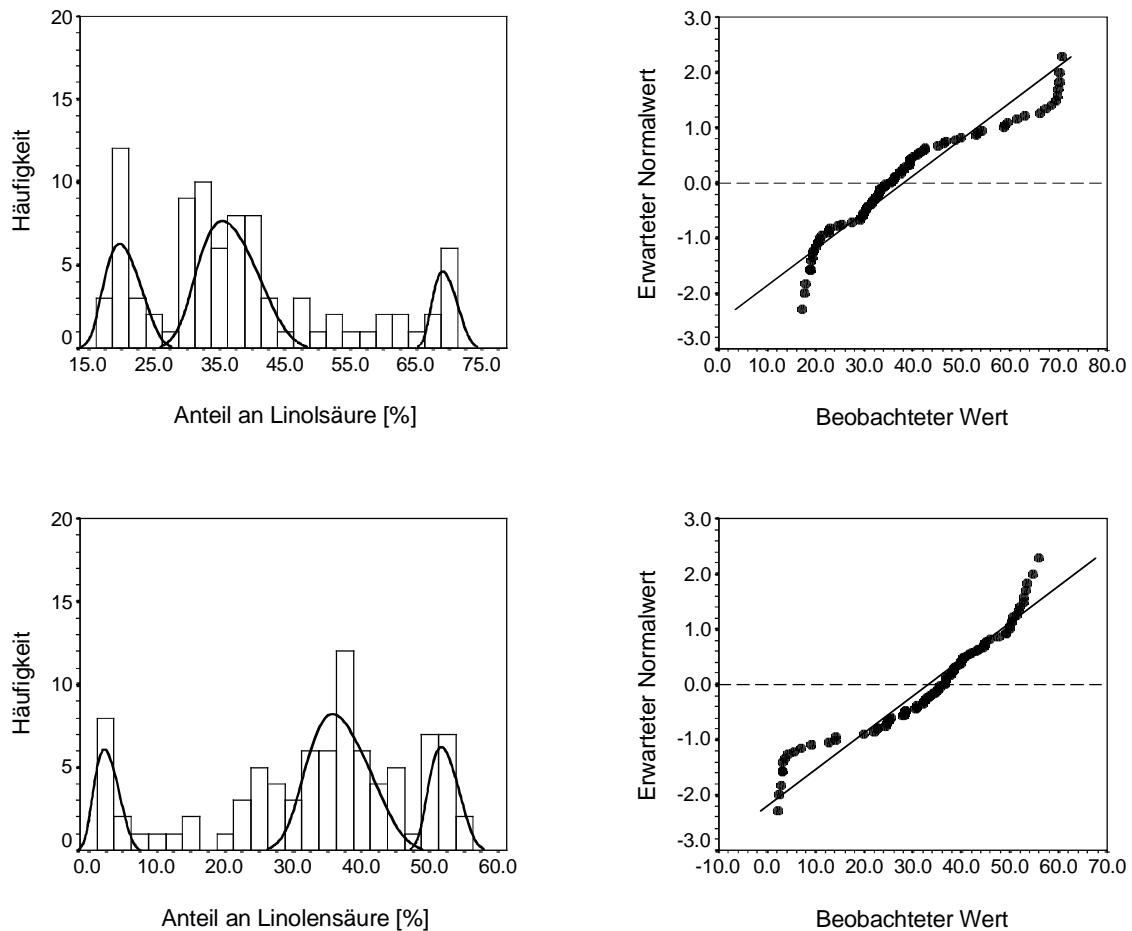
So besaß die Linie VM-024 lediglich 24,5% des Linolgehaltes der Linie VM-128, bei welcher der höchste Anteil an Linolsäure im Fettsäure-Muster gemessen wurde. Noch größer fiel der relative Unterschied in den relativen Anteilen der Linolensäure aus. Der Linolengehalt im Samenöl der Linie VM-005 betrug nur 3,8% des Linolengehaltes bei der Linie VM-017.

Für alle beobachteten Merkmale wurde geprüft, ob die einzelnen Merkmale innerhalb der untersuchten Population normalverteilt sind. Der Test auf Normalverteilung nach Kolmogoroff-Smirnov zeigte, daß für alle Merkmale eine Abweichung von der Normalverteilung auf einem Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,01$  ausgeschlossen werden konnte. Die Verteilung der Merkmale innerhalb der Kartierungspopulation ist in Abbildung 21 und 22 dargestellt. Zur Überprüfung der Normalverteilung wurden jeweils auch die zugehörigen Wahrscheinlichkeitsdiagramme (Q-Q-Diagramme) aufgeführt. Für die Merkmale „Relativer Gehalt an Palmitinsäure“, „Relativer Gehalt an Stearinsäure“ sowie „Relativer Gehalt an Ölsäure“ ist hierbei ebenfalls keine Abweichung von einer Normalverteilung feststellbar. Die Merkmale „Relativer Gehalt an Linolsäure“ und „Relativer Gehalt an Linolensäure“ zeigen in dieser Analyse jedoch Abweichungen von der Normalverteilung in den Randklassen. Daher wurde in der Darstellung der Häufigkeitsverteilung dieser Merkmale auf die Berechnung einer Normalverteilungskurve verzichtet. Stattdessen wurde das Vorliegen von drei Normalverteilungen innerhalb dieser Merkmale angenommen.



**Abb. 21:** Häufigkeitsverteilungen (*links*) und die dazugehörigen Wahrscheinlichkeitsdiagramme (jeweils *rechts daneben*) für die Merkmale „Relativer Gehalt von Palmitinsäure“, „Relativer Gehalt an Stearinsäure“ sowie „Relativer Gehalt an Ölsäure“.

Erläuterung siehe Abb. 16.



**Abb. 22:** Häufigkeitsverteilungen (*links*) und die dazugehörigen Wahrscheinlichkeitsdiagramme (*jeweils rechts daneben*) für die Merkmale „Relativer Gehalt an Linolsäure“ sowie „Relativer Gehalt an Linolensäure“.

Erläuterung siehe Abb. 16.

### 3.3.2.3 Korrelation der Merkmale untereinander

Eine Korrelation der erhobenen Parameter konnte in dieser Population nur zwischen zwei Parametern festgestellt werden (Tab. 34). Korreliert sind der relative Gehalt an Stearinsäure ( $C_{18:0}$ ) mit dem relativen Gehalt an Ölsäure ( $C_{18:1}$ ) sowie der relative Gehalt an Linolsäure ( $C_{18:2}$ ) mit dem an Linolensäure ( $C_{18:3}$ ). In beiden Fällen handelt es sich um Zwischenprodukte direkt aufeinanderfolgender Syntheseschritte. Der relative Gehalt an Palmitinsäure ( $C_{16:0}$ ) ist allerdings nicht korreliert mit dem relativen Gehalt an Stearinsäure ( $C_{18:0}$ ).

**Tab. 34:** Korrelationen der erhobenen Parameter für das Fettsäuremuster im Samenöl.

Fettsäure	Palmitinsäure	Stearinsäure	Ölsäure	Linolsäure
Palmitinsäure				
Stearinsäure	-0,005			
Ölsäure	-0,200	+0,279*		
Linolsäure	+0,198	-0,108	-0,129	
Linolensäure	-0,196	-0,023	-0,041	-0,984**

\* Die Korrelation ist signifikant auf einem Niveau von  $\alpha=0,05$ .

\*\* Die Korrelation ist signifikant auf einem Niveau von  $\alpha=0,01$ .

Dargestellt sind die jeweiligen Korrelationskoeffizienten nach Pearson.

### 3.3.2.4 Lokalisierung von QTLs für das Fettsäure-Muster im Samenöl

#### Relativer Gehalt an Palmitinsäure ( $C_{16:0}$ ) im Samenöl

In der Population II [Viking x McGregor-E1747] konnten für das Merkmal „Relativer Gehalt an Palmitinsäure ( $C_{16:0}$ ) im Samenöl“ 3 QTLs lokalisiert werden (Tab. 35). Diese QTLs erklären zusammen 22,1 +/- 7,9% der phänotypischen Varianz. Der Wirkung der einzelnen QTLs liegt jeweils zwischen 4,0 und 13,0%. Alle QTLs wurden auf verschiedenen Kopplungsgruppen, nämlich VM-2, VM-10 sowie VM-17, lokalisiert (Abb. 23).

**Tab. 35:** Ergebnisse der Intervall-QTL-Lokalisierung für das Merkmal „Relativer Gehalt an Palmitinsäure ( $C_{16:0}$ ) im Samenöl“.

QTL	KG	Marker 1	Marker 2	LOD	$r^2$ [%]	Add. Effekt	AIC
$C_{16:0}$ -1	VM-17	AGT/CTG-256	AGC/CTG-257	3,94	13,0	- 0,170	
$C_{16:0}$ -2	VM-2	AGA/CAT-099	AGA/CAT-168	3,92	7,9	- 0,193	
$C_{16:0}$ -3	VM-10	ACC/CTC-184	AGT/CAA-195	3,48	4,0	- 0,161	
Gesamt				4,66	22,1		-9,46

„QTL“ ist die Bezeichnung des detektierten QTL. „KG“ gibt an, auf welcher Kopplungsgruppe der jeweilige QTL lokalisiert werden. Die numerische Nomenklatur richtet sich nach der Größe des durch den QTL erklärten Anteils an der phänotypischen Varianz (i.e. Größe des  $r^2$ ). „Marker 1“ und „Marker 2“ flankieren das untersuchte Intervall. „LOD“ repräsentiert den LOD-Wert für den betreffenden QTL. „ $r^2$ “ gibt den prozentualen Anteil der phänotypischen Varianz wieder, welcher durch die detektierten QTLs erklärt wird. „Add. Effekt“ gibt die Größe des additiven Effektes des detektierten QTLs an unter der Annahme, daß der Elter McGregor-E1747 Träger der günstigeren Allele für das untersuchte Merkmal ist. Der „AIC“-Wert (=Akaike's Information Criterion) stellt eine Größe für die statistische Güte der QTL-Analyse dar.

### Relativer Gehalt an Stearinsäure ( $C_{18:0}$ ) im Samenöl

Für das Merkmal „Relativer Gehalt an Stearinsäure ( $C_{18:0}$ ) im Samenöl“ konnten insgesamt 5 QTLs berechnet werden (Tab. 36; Abb. 23). Einen relativ großen Anteil an der phänotypischen Varianz besitzt mit 30,5% der QTL  $C_{18:0-1}$ , welcher auf der Kopplungsgruppe VM-10 lokalisiert werden konnte. Der LOD-Wert dieses QTLs fällt mit 8,93 relativ hoch aus.

Auf Kopplungsgruppe VM-2 konnten zwei QTLs kartiert werden, welche jeweils ca. 14% der phänotypischen Varianz erklären. Der Abstand zwischen den QTLs bzw. deren flankierenden Markern beträgt 69,0 cM. Beide QTLs sollten daher wie ungekoppelte Loci vererbt werden.

**Tab. 36:** Ergebnisse der Intervall-QTL-Lokalisierung für das Merkmal „Relativer Gehalt an Stearinsäure ( $C_{18:0}$ ) im Samenöl“.

QTL	KG	Marker 1	Marker 2	LOD	$r^2$ [%]	Add. Effekt	AIC
$C_{18:0-1}$	VM-10	AGT/CTG-343	AAC/CTC-131	8,93	30,5	+ 0,326	
$C_{18:0-2}$	VM-13	AGA/CAA-299	AAT/CTC-143	4,91	16,0	- 0,217	
$C_{18:0-3}$	VM-2	ATC/CTG-313	AGA/CAA-384	5,52	14,3	+ 0,283	
$C_{18:0-4}$	VM-2	AGG/CAT-098	AAG/CGG-226	4,23	14,1	+ 0,213	
$C_{18:0-5}$	VM-1	AGT/CTC-096	AGT/CTG-158	3,67	5,7	- 0,217	
<i>Gesamt</i>				12,27	48,2		-36,49

Erläuterung siehe Tab. 35.

Zwei weitere QTLs kartierten auf Kopplungsgruppe VM-13 und VM-1. Alle fünf lokalisierten QTLs erklärten zusammen 48,2 +/- 7,8% der phänotypischen Varianz.

### Relativer Gehalt an Ölsäure ( $C_{18:0}$ ) im Samenöl

Für das Merkmal „Relativer Gehalt an Ölsäure ( $C_{18:0}$ ) im Samenöl“ konnten drei QTLs berechnet werden, welche zusammen 29,6 +/- 8,3% der beobachteten Varianz in dem Phänotyp erklärten (Tab. 37). Den größten Anteil der genotypischen Varianz stellt QTL  $C_{18:1-1}$  mit einem prozentualen  $r^2$ -Wert von 21,2%. Dieser QTL konnte mit einem relativ hohen LOD-Wert von 7,46 auf Kopplungsgruppe VM-2 kartiert werden (Abb. 23).

**Tab. 37:** Ergebnisse der Intervall-QTL-Lokalisierung für das Merkmal „Relativer Gehalt an Ölsäure ( $C_{18:1}$ ) im Samenöl“.

QTL	KG	Marker 1	Marker 2	LOD	$r^2$ [%]	Add. Effekt	AIC
$C_{18:1-1}$	VM-2	AGA/CTA-081	AAC/CTC-258	7,46	21,2	+ 1,023	
$C_{18:1-2}$	VM-12	AGA/CAT-092	AGA/CAT-091	3,18	9,0	+ 0,638	
$C_{18:1-3}$	VM-17	AGC/CTG-257	AGC/CTG-279	5,61	8,9	- 0,901	
<i>Gesamt</i>				6,56	29,6		-18,22

Erläuterung siehe Tab. 35.

Zwei weitere statistisch weniger signifikante QTLs, welche jeweils ca. 9% der phänotypischen Varianz beschreiben, konnten auf den Kopplungsgruppen VM-12 und VM-17 lokalisiert werden.

#### *Relativer Anteil an Linolsäure ( $C_{18:2}$ ) im Samenöl*

Lediglich ein QTL konnte für das Merkmal „Relativer Anteil an Linolsäure ( $C_{18:2}$ ) im Samenöl“ berechnet werden (Tab. 38). Der QTL  $C_{18:2-1}$  kartiert auf Kopplungsgruppe VM-12 (Abb. 23). Dieser QTL erklärt alleine 35,2 +/- 8,3% der phänotypischen Varianz. Der LOD-Wert für den QTL  $C_{18:2-1}$  beträgt 12,47 bzw., nach der finalen Regressionsanalyse, 8,09; dieser QTL zeichnet sich also durch eine relativ hohe statistische Güte aus.

**Tab. 38:** Ergebnisse der Intervall-QTL-Lokalisierung für das Merkmal „Relativer Gehalt an Linolsäure ( $C_{18:2}$ ) im Samenöl“.

QTL	KG	Marker 1	Marker 2	LOD	$r^2$ [%]	Add. Effekt	AIC
$C_{18:2-1}$	VM-12	AGA/CAT-091	AGT/CAA-435	8,09*	35,2	- 10,057	-33,26

\* Der LOD-Wert vor der finalen Regressionsanalyse liegt bei 12,47.

Weitere Erläuterungen siehe Tab. 35.

Bei einer Senkung des LOD-Grenzwertes von 3,0 auf 2,0 können zwei zusätzliche QTLs lokalisiert werden. Beide QTLs kartieren bei LOD-Werten von 2,31 bzw. 2,79 auf Kopplungsgruppe VM-1, und zwar in den Intervallen AAG/CGA-136 und AGA/CAT-043 sowie AAT/CTC-054 und AGT/CTC-054. Der Abstand zwischen diesen beiden QTLs bzw. zwischen deren flankierenden Markern beträgt 20,2 cM.

### Relativer Gehalt an Linolensäure ( $C_{18:3}$ ) im Samenöl

Für das Merkmal „Relativer Gehalt an Linolensäure ( $C_{18:3}$ ) im Samenöl“ wurden vier QTLs lokalisiert (Tab. 39). Den größten Anteil an der genotypischen Varianz besitzt QTL  $C_{18:3-1}$ , welcher alleine 44,5% der phänotypischen Varianz erklärt. Dieser QTL wurde auf Kopplungsgruppe VM-12 kartiert (Abb. 23). Zwei weitere QTLs,  $C_{18:3-2}$  und  $C_{18:3-3}$ , kartieren auf Kopplungsgruppe VM-1 im Abstand von 25,2 cM. Sie erklären jeweils etwa 10% der phänotypischen Varianz. Ein QTL mit geringerer Wirkung konnte auf Kopplungsgruppe VM-2 detektiert werden. Insgesamt erklären alle vier QTLs 60,0 +/- 6,7% der phänotypischen Varianz. Der LOD-Wert liegt bei allen QTLs über 4,0. Der AIC-Wert fällt mit -62,73 sehr gering aus, die lokalisierten QTLs verfügen daher über eine hohe statistische Güte.

**Tab. 39:** Ergebnisse der Intervall-QTL-Lokalisierung für das Merkmal „Relativer Gehalt an Linolensäure ( $C_{18:3}$ ) im Samenöl“.

QTL	KG	Marker 1	Marker 2	LOD	$r^2$ [%]	Add. Effekt	AIC
$C_{18:3-1}$	VM-12	AGA/CAT-091	AGT/CAA-435	4,00	44,5	+ 7,194	
$C_{18:3-2}$	VM-1	AAG/CGA-136	AGA/CAT-043	4,33	14,0	+ 4,910	
$C_{18:3-3}$	VM-1	AGT/CTC-054	AAT/CTC-096	4,83	12,0	+ 5,175	
$C_{18:3-4}$	VM-2	ATC/CTG-313	AGA/CAA-384	4,88	9,7	- 6,468	
<i>Gesamt</i>				<i>17,10</i>	<i>60,0</i>		<i>-62,73</i>

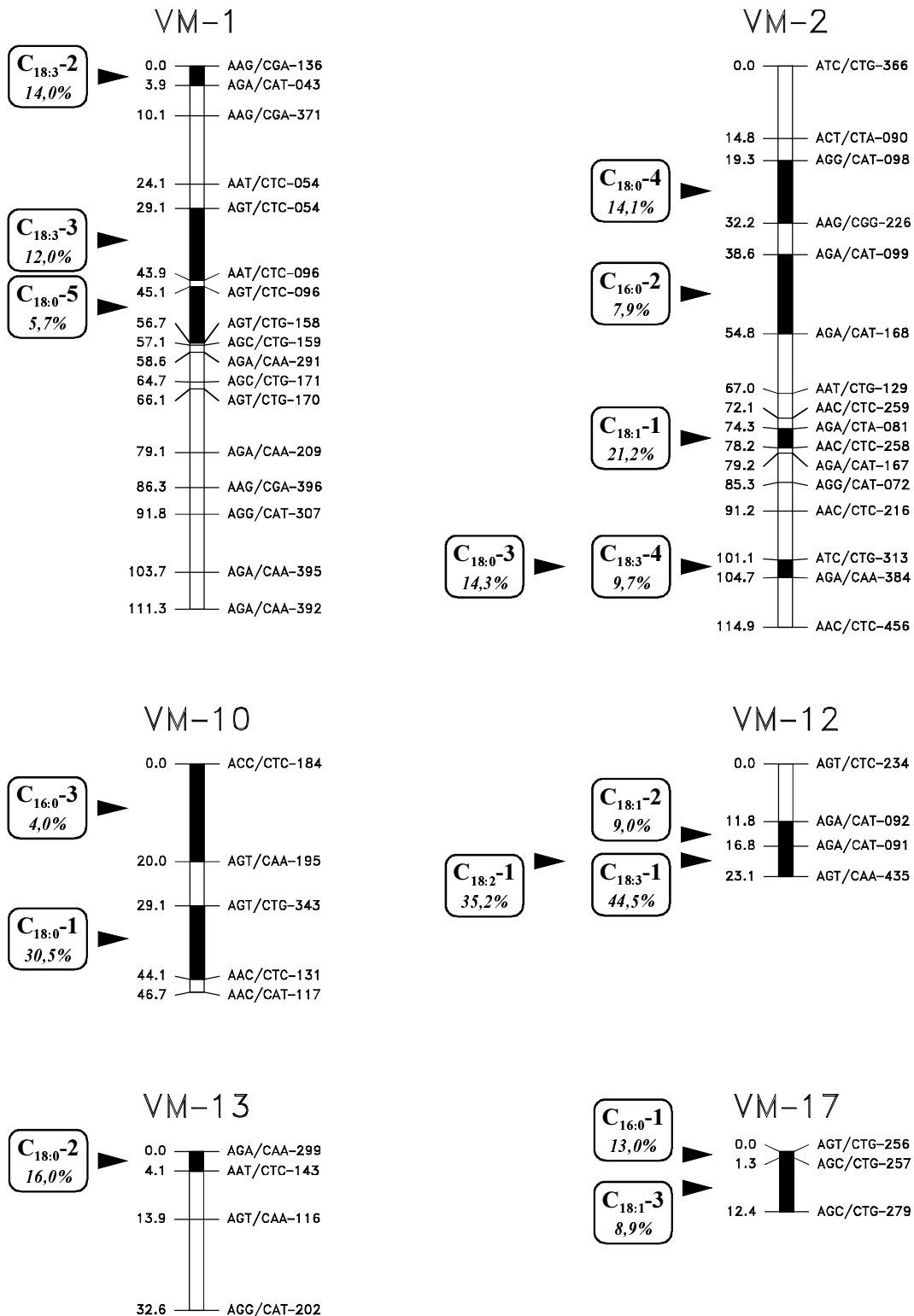
Erläuterung siehe Tab. 35.

### Lokalisierung der QTLs auf den Kopplungsgruppen

In Abbildung 23 ist die Verteilung der detektierten QTLs auf den Kopplungsgruppen der Population II [Viking x McGregor-E1747] dargestellt. QTLs konnten auf sechs der insgesamt sieben Kopplungsgruppen lokalisiert werden.

Auf zwei Kopplungsgruppen wurden unterschiedliche QTLs für identische Markerintervalle berechnet. Auf Kopplungsgruppe VM-2 wurde ein QTL für den relativen Gehalt an Stearinsäure ( $C_{18:0-3}$ ) und ein QTL für den relativen Gehalt an Linolensäure ( $C_{18:3-4}$ ) in dem gleichen Markerintervall lokalisiert. Auf Kopplungsgruppe VM-12 wurde ein QTL für den relativen Gehalt an Linolensäure ( $C_{18:2-1}$ ) und ein QTL für den relativen Gehalt an Linolensäure ( $C_{18:3-1}$ ) in einem identischen Markerintervall kartiert.





**Abb. 23:** Lokalisierung der QTLs für das Fettsäuremuster im Samenöl in der Population II [Viking x McGregor-E1747].

Angegeben ist jeweils die Bezeichnung des QTLs sowie der entsprechende prozentuale  $r^2$ -Wert.

### 3.3.2.5 Transgression

Auch für diese Population soll abschließend eine Übersicht über die Transgressions-effekte sowie deren Vergleich mit den QTL-Effekten gegeben werden (Tab. 40).

**Tab. 40:** Merkmalsausprägungen der Kreuzungseltern sowie der RI-Linien der Population II [Viking x McGregor-E1747].

Merkmal	Eltern		Population			
	Viking [%]	McGregor [%]	Min <sub>RIL</sub> [%]	Max <sub>RIL</sub> [%]	Min <sub>QTL</sub> [%]	Max <sub>QTL</sub> [%]
Palmitinsäure	5,4	7,1	5,0	7,4	5,1	6,6
Stearinsäure	3,3	3,5	2,2	5,2	2,4	-*
Ölsäure	21,2	18,3	14,3	27,0	17,8	21,6
Linolsäure	17,5	43,7	17,3	70,7	27,6	47,3
Linolensäure	51,9	26,6	2,1	55,9	9,9	51,1

\* Es wurden keine RI-Linien mit entsprechender Allel-Kombination gefunden. Weitere Erläuterungen siehe Tab. 31.

Bei allen Merkmalen konnte eine zum Teil erhebliche Transgression in den Linien der Nachkommenschaft beobachtet werden. Das Ausmaß der Transgression ist unabhängig von den Unterschieden zwischen den Elternlinien, wie z.B. die Ergebnisse für das Merkmal „Relativer Gehalt an Linolsäure im Samenöl“ zeigen. Für alle Merkmale konnte ebenfalls eine Transgression für die durch die Kombination der detektierten QTLs gebildeten Klassen beobachtet werden.

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Die genetische Diversität innerhalb der Kultursorten des Leins

Analysen der genetischen Diversität innerhalb der Kultursorten von *Linum usitatissimum* L. subsp. *usitatissimum* fanden bislang nur vereinzelt statt. Dieses begründet sich in mehreren Umständen. Eine wesentliche Ursache ist, daß seit Beginn des 20. Jahrhunderts der Kulturleinanbau in den europäischen Ländern stark rückläufig ist. Der Beginn der modernen Pflanzenzüchtung fiel zusammen mit einem nachlassenden wirtschaftlichen Interesse an der Leinzüchtung. Daher fand eine systematische wissenschaftliche Betrachtung des Leins im Gegensatz zu anderen Kulturpflanzen nicht oder nur selten statt. Durchgeführt wurden lediglich taxonomische Analysen innerhalb der Gattung *Linum* sowie Untersuchungen über die Phylogenie des Kulturleins. Methodisch beschränkte man sich in erster Linie auf morphologische Merkmale, vereinzelt wurden auch cytologische und biochemische Analysen angewendet.

Für die Fragestellung nach der taxonomischen Einordnung einzelner *Linum*-Arten führen diese Methoden durchaus zu sicheren Ergebnissen. Innerhalb der Art *Linum usitatissimum* L. sind morphologische Charakteristika jedoch nur in begrenzter Zahl verfügbar. Schon die Frage, ob die Varietät *angustifolium* eine Subspezies von *Linum usitatissimum* L. darstellt oder doch eine eigene Art bildet, war lange Zeit umstritten.

Die Kultursorten des Lein lassen sich in zwei Formenkreise, Öllein-Typen und Faserlein-Typen einteilen. Diese Klassifizierung erfolgt allerdings nur nach relativ groben Kriterien (z.B. Wuchs, Samenertrag). Die Einordnung einzelner Sorten in diese Formenkreise ist manchmal nicht ohne weiteres möglich. Untersuchungen, inwieweit sich diese zwei Formenkreise nicht nur morphologisch sondern auch genetisch unterscheiden, wurden bislang nicht durchgeführt.

Einen Ansatz zur Klärung dieser Fragestellungen bietet die Anwendung molekularer Markertechniken. Da züchterische Daten über die genetische Diversität und den genetischen Hintergrund der Kultursorten des Leins nicht verfügbar waren, wurde in dieser Arbeit die Anwendung molekularer Marker zur Analyse der genetischen Diversität untersucht.

Trotz der zum Teil kontroversen Diskussion über die Reproduzierbarkeit der RAPD-Technik ist ihre Anwendung bei der Diversitätsanalyse innerhalb einzelner Arten unbestritten und durch mehrere Studien belegt (TINGEY et al. 1992, GONZALES & FERRER 1993, THORMANN et al. 1994). Da es sich bei der RAPD-Technik außerdem um eine

schnelle und kostengünstige Methode handelt, wurde diese Markertechnik für eine erste molekulare Diversitätsanalyse innerhalb der Kultursorten des Lein verwendet.

Bei der in dieser Arbeit durchgeführten Diversitätsanalyse zeigte sich eine enge Verwandtschaft innerhalb der Sorten des Faserleintyps. Dabei weisen die Sorten Hermes und Ariane sowie Argos und Viking sowohl in den Clusteranalysen als auch in der multidimensionalen Skalierung (MDS) untereinander eine relativ hohe Ähnlichkeit auf. Im Unterschied dazu bilden die Ölleinsorten Atalante, Szegedi62, Linore und McGregor-E1747 eine relativ divergente Gruppe, die sich generell durch eine größere interne Diversität als die der Faserleine auszeichnet. Dieses kann unter Umständen mit den wesentlich größeren Züchtungsbemühungen im europäisch/amerikanischen Raum bezüglich der Ölleine zusammenhängen.

Auffällig ist weiterhin, daß die amerikanische Faserleinsorte Cascade sich deutlich von den europäischen Faserlein-Sorten unterscheidet. Vielmehr zeigt sie eine deutlichere Ähnlichkeit zu den Ölleinsorten Atalante und McGregor-E1747.

Insgesamt liefern diese Analysen ein Indiz dafür, daß sich bei den zwei Formenkreisen des Kulturleins durchaus ein unterschiedlicher genetischer Hintergrund vermutet werden kann. Einen endgültigen Beweis dieser These kann jedoch nur eine wesentlich umfangreichere Analyse des Genpools *Linum usitatissimum* L. erbringen.

Die Clusteranalysen der genetischen Korrelationen wurden sowohl nach der Average-Linkage-Methode als auch nach der Methode nach Ward durchgeführt. Die Zuordnung der einzelnen Sorten erfolgte bei beiden Berechnungen im Prinzip ähnlich. Unterschiede traten lediglich bei der Bildung von Über-Clustern auf. Dieses ist in erster Linie auf die geringe Zahl getesteter Sorten zurückzuführen. Dadurch ließen sich relativ viele Grenzfälle beobachten, bei denen die Zuordnung zu Clustern je nach der Methode der Clusterbildung unterschiedlich ausfiel. Zusammenfassend läßt sich jedoch sagen, daß die Methode zur Berechnung der Cluster nur wenig Einfluß auf die Gruppierung der Cluster hat. Für eine zuverlässige Interpretation der Distanzen ist vielmehr der Vergleich der Clusterbildung mit der multidimensionalen Skalierung der Diversitätsdaten erforderlich.

Anhand dieser Daten konnte eine Einschätzung der für die Genomkartierung verwendeten Populationen vorgenommen werden. Die Population I stammte aus einer

Kreuzung der Ölleinsorten Szegedi62 mit Atalante. Diese beiden Sorten unterscheiden sich durch eine relativ hohe genetische Distanz ( $GD = 0,417$ ). Größer fiel innerhalb der Ölleinsorten nur die Distanz zwischen Atalante und Linore aus ( $GD = 0,477$ ). Allerdings zeigte Atalante zu Szegedi62 mehr Unterschiede im Phänotyp als zu Linore, so zum Beispiel bei der Samenfarbe oder der Wuchsform. Für eine weitere Population sollte die Mutationslinie McGregor-E1747 aufgrund ihres modifizierten Fettsäuremusters verwendet werden. Gleichzeitig sollte ein Vertreter der Faserleine den anderen Kreuzungselter stellen, um eine möglichst breite Variation innerhalb der Kulturleinsorten abzudecken. Aufgrund der engen Verwandtschaft innerhalb der Faserleine wiesen sowohl Hermes als auch Ariane, Argos und Viking zu McGregor-E1747 eine ähnliche Distanz auf, so daß für die Auswahl des anderen Elters die genetische Distanz nicht berücksichtigt werden brauchte. Die Population II wurde daher aus einer Kreuzung Viking mit McGregor-E1747 abgeleitet. Mit einem Unähnlichkeitsmaß von  $GD = 0,373$  fiel die genetische Diversität in dieser Population allerdings etwas geringer aus als in der Population I.

## 4.2 Die Genomkartierung mittels molekularer Marker

### 4.2.1 Das Spaltungsverhalten der Marker

In der Population I [Szegedi62 x Atalante] wurden insgesamt 153 Markerloci detektiert. Von 124 detektierten AFLP-Markern zeigten 45 (36,3%) eine von der erwarteten 1:1-Spaltung abweichende Verteilung. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse der Spaltungsanalyse in der Population II [Viking x McGregor-E1747]. Hier entsprachen wesentlich weniger AFLP-Marker nicht der erwarteten 1:1-Spaltung. Von 129 detektierten Markerloci stimmten 29 (22,5%) nicht mit der erwarteten Spaltung überein. SPIELMEYER et al. (1998 b) fanden bei der von ihnen durchgeführten Kartierung des Kulturleins ähnliche Spaltungsstörungen: 28% der detektierten AFLP-Markerloci wichen von der erwarteten 1:1-Spaltung ab.

Segregationen abweichend von den erwarteten (theoretischen) Spaltungsverhältnissen treten bei allen Klassen molekularer Marker häufig auf. Dieses läßt sich für eine Reihe von Species belegen. Die gestörte Segregation scheint abhängig vom Populationstyp zu sein. In einer Analyse von 53 Populationen verschiedener Pflanzenarten fanden XU et al. (1997), daß in RI-Populationen durchschnittlich 39,4% aller Marker eine gestörte Segregation aufweisen, in DH-Populationen dagegen nur 29,4% und in BC-Populationen nur 28,6%. F<sub>2</sub>-Populationen zeigen mit durchschnittlich 19,3% die niedrigsten Häufigkeiten an Markern mit gestörter Segregation. Im Extremfall lassen sich sogar nahezu keine Marker finden, die der erwarteten Spaltung entsprechen. So beschreiben WANG et al. (1994) eine RI-Population bei Reis [CO93 x Moroberekan], bei der 98,8% aller (RFLP-) Marker eine gestörte Segregation aufwiesen.

Allein auf AFLP-Marker bezogen, findet man ebenfalls z.T. erhebliche Abweichungen von den erwarteten Spaltungsverhältnissen. Bei einer Analyse einer RI-Population der Hirse fanden BOVIN et al. (1999), daß 11,7% aller AFLP-Marker eine gestörte Segregation zeigten. In einer DH-Population bei Reis wiesen sogar 21,6% der AFLP-Marker eine gestörte Segregation auf (MAHESWARAN et al. 1997).

Eine Änderung der Spaltungsverhältnisse kann sowohl durch genetische als auch durch physiologische Faktoren bedingt sein. Genetische Faktoren können die Bildung bestimmter Gameten geschlechtsspezifisch behindern. Ebenfalls können sie eine selektive Befruchtung bewirken, so daß einzelne (männliche) Genotypen von der Vermehrung ausgeschlossen werden. Letzteres wird in erster Linie durch selektive Einflüsse des Gynoeceums bedingt (OTTAVIANO et al. 1982), welches wiederum

durch eine genetische Inkompatibilität zwischen Pollen und Gynoeceum (GEBHARDT et al. 1991) oder durch Umwelteinflüsse (ZAMIR et al. 1982) verursacht werden kann. Hinweise für ein Vorliegen solcher segregations-beeinflussender genetischer Faktoren, dieses können sowohl Monogene als auch enggekoppelte Polygene sein, kann eine Häufung von Markern mit einer gestörten Spaltung in diskreten Regionen von Kopplungsgruppen bzw. Chromosomen sein. In diesen Regionen sollten dann auch unterschiedliche Markertypen ähnliche Spaltungsverhältnisse aufweisen. Je enger die Kopplung der Markerloci zu dem genetischen Faktor ist, desto größer sollte dann die gestörte Spaltung sein.

Solche Gene wurden bislang nur für monokotyle Arten beschrieben. Bei Reis wurden insgesamt 15 Gametophytengenloci (Abk. *ga*) sowie 20 Sterilitätsloci (*S*) lokalisiert (XU et al. 1997). Für die Gerste konnten 2 *ga*-Loci kartiert werden (KONISHI et al. 1988); es liegen Hinweise auf einen dritten Genlocus vor (MOHLER 1998). Für dicotyle Arten liegen keine Untersuchungen über solche Genloci vor.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse der Markerverteilung zeigen, daß sich Marker mit einer gestörten Segregation in beiden untersuchten Populationen in der Mehrzahl der Kopplungsgruppen finden. Betrachtet man lediglich die Klasse der AFLP-Markerloci, welche in beiden Kartierungen die Majorität unter den Markern bilden, so treten in beiden Populationen jeweils drei Kopplungsgruppen mit mehr als 50% Marker mit einer gestörten Spaltung auf. In der Kopplungskarte von SPIELMEYER et al. (1998 b) zeigte sich ein ähnliches Verhalten der AFLP-Markerloci mit einer gestörten Segregation. Solche Markerloci fanden sich nicht nur auf einzelnen sondern vielmehr auf allen Kopplungsgruppen. Zwei Kopplungsgruppen bestanden jedoch überwiegend aus diesen Markern. Sofern es sich bei allen diesen Kopplungsgruppen um identische Chromosomen handelt, könnten diese Befunde ein Indiz für das Vorliegen genetischer Faktoren sein, welche die Vererbung einzelner Genotypen behindern. Dieses kann jedoch nur anhand eines Kartenvergleichs, unter Umständen sogar nur anhand der Erstellung einer Konsensuskarte, geschehen.

Gestörte Segregationen können, wie bereits erwähnt, auch durch den Einfluß physiologischer Faktoren begründet sein. Solche Einflüsse lassen sich vor allem bei DH-Populationen beobachten, bei denen ein Elter besser auf die *in-vitro*-Kulturbedingungen reagiert (GRANER et al. 1991, YAMAGASHI et al. 1996). In RI-

Populationen lassen sich aufgrund der wiederholten Einzelkornvermehrung und dem damit verbundenen kumulativen Effekt genetische und physiologische Einflüsse nur schwer trennen. Für die Population I [Szege62 x Atalante] wurden 2 reziproke Kreuzungen verwendet, anhand derer das Auftreten von Markern mit gestörter Segregation untersucht wurde (Tab. 18). 19 Marker, 15 AFLP-Loci und 4 RAPD-Loci, zeigten bei beiden Kreuzungen eine gestörte Spaltung. Zusätzlich zu diesen Markern wiesen in jeder Teilpopulation weitere 24 bzw. 19 Marker abweichende Spaltungsverhältnisse auf. Genetische Faktoren sollten sich in erster Linie entweder über die männlichen oder über die weiblichen Gametophyten auswirken, daher sollten reziproke Kreuzungen bezüglich solcher Loci unterschiedliche Genotypverteilungen aufweisen. Dieses hätte dann zur Folge, daß Chromosomenbereiche lediglich in einer reziproken Kreuzung eine gestörte Spaltung zeigen, in der komplementären Kreuzung dagegen sollten reguläre Spaltungsverhältnisse zu beobachten sein. Physiologische Effekte sollten sich in beiden reziproken Kreuzungen ähnlich auswirken.

In keiner der beiden reziproken Kreuzungen der Population I konnte eine diskrete Verteilung der Marker mit gestörter Segregation beobachtet werden; diese Markerloci waren in etwa gleichmäßig über die Kopplungsgruppen verteilt. Lediglich in der Kopplungsgruppe SA-2 zeigte eine Gruppe von sechs AFLP-Loci eine gestörte Segregation, welche sich nur in der Kreuzung, bei der die Sorte Atalante den Vater stellte, beobachten ließ. Dieses könnte ein Indiz für das Vorliegen eines genetischen Faktors auf der Kopplungsgruppe SA-2 sein, welcher bestimmte (männliche) Gametophyten diskriminiert.

#### **4.2.2 Größe und Umfang der vorgestellten Kopplungskarten**

Die Berechnung der Kopplungskarte für die Population I [Szege62 x Atalante] ergab insgesamt 16 Kopplungsgruppen. Damit wurde eine Kopplungsgruppe mehr berechnet als der Lein Chromosomen zählt. Die Kopplungskarte der Population II [Viking x McGregor-E1747] umfaßt mit 17 Kopplungsgruppen 2 Kopplungsgruppen mehr als erwartet.

Das Auftreten überzähliger Kopplungsgruppen kommt gerade bei Kartierungen, welche sich noch im Anfangsstadium befinden, häufig vor. So berechneten SPIELMEYER et al (1998 b) insgesamt 18 Kopplungsgruppen für den Lein. Solange nur relativ we-



nige Marker kartiert sind, kann es aufgrund einer Zufallsverteilung der Marker durchaus zu größeren Abständen zwischen den Markern kommen. Da Rekombinationsfrequenzen über 40 cM zwischen zwei Markern als nicht mehr signifikant für eine Kopplung angesehen werden müssen, würden in einem solchen Fall zwei anstatt nur einer Kopplungsgruppe berechnet werden. Gleichfalls können beim Lein auch die cytologischen Voraussetzungen Ursache für einen ‚Zerfall‘ einzelner Kopplungsgruppen sein. Der Lein besitzt ein ‚Nucleolenchromosom‘, bei dem ein kleinerer Chromosomenabschnitt über einen euchromatischen Abschnitt mit dem Haupt-Chromosomenabschnitt verbunden ist. Unter Umständen lassen sich in dieser euchromatischen Struktur, deren genauer biochemischer Aufbau bislang nicht näher untersucht worden ist, mit geringerer Wahrscheinlichkeit Marker detektieren, so daß in diesem Fall immer zwei anstatt nur eine Kopplungsgruppe berechnet wird.

Ebenso kann eine Verteilung der Marker abweichend von der Zufallsverteilung vorliegen. Diese kann durch zwei Faktoren bedingt sein. Zum einen muß in Betracht gezogen werden, daß die Kreuzungseltern beider analysierten Populationen über einen relativ hohen gemeinsamen genetischen Hintergrund verfügten. Dieses wird durch die durchgeführte Diversitätsanalyse belegt: Die Genetische Distanz für die Kreuzungseltern der Population I, Szegedi62 und Atalante, betrug 0,417, für Viking und McGregor-E1747, die Eltern der Population II, 0,373. Daher ist es denkbar, daß das Genom der Elternsorten in manchen Sequenzabschnitten gleich ist. In solchen Bereichen würde man keine polymorphen Marker finden. Trifft dieses zu, so müßte eine Korrelation zwischen der genetischen Distanz und der Häufigkeit des Auftretens identischer DNA-Sequenzen bestehen. Je enger dann die Kreuzungseltern miteinander verwandt sind, um so häufiger müßten zusätzliche Kopplungsgruppen auftreten. Ein Indiz für diese Überlegung ist, daß für die Population II bei einer niedrigeren genetischen Distanz der Eltern bei gleichem LOD mehr Kopplungsgruppen berechnet wurden. SPIELMEYER et al. (1998 b) haben leider keine Untersuchungen über die genetische Distanz ihrer Kreuzungseltern, Glenleg und einer Linola-Zuchtlinie, durchgeführt. Da es sich bei beiden um australische Ölleintypen handelt, ist aber eine relativ enge Verwandtschaft anzunehmen. Der Polymorphiegrad der AFLP-Analyse kann nicht zu Vergleichen herangezogen werden, da die AFLP-Technik in der Bewertung der amplifizierten Fragmente gerade bei der automatisierten Detektion einen hohen Spielraum läßt, im Gegensatz zu der RFLP-Analyse oder auch der RAPD-Technik.

Auch bei anderen Kulturpflanzen führen Kopplungsanalysen mittels molekularer Marker nicht automatisch zu der „richtigen“ Anzahl von Kopplungsgruppen. So berechneten MENDENEZ et al. (1997) für die erste Kopplungskarte für *Vigna unguiculata* L. mit zwölf Kopplungsgruppen eine zusätzliche Kopplungsgruppe. Für die Zichorie (*Cichorium intybus* L.) erstellten DE SIMONE et al. (1997) eine Karte anhand PCR gestützter Marker. Anstelle der zu erwartenden 9 Kopplungsgruppen ( $n = 9$ ) berechneten DE SIMONE et al. 13 Kopplungsgruppen. Selbst bei Kulturarten, die schon lange Objekt molekulargenetischer Analysen sind, lassen sich nicht alle Kopplungsgruppen problemlos mit Chromosomen korrelieren.

Selbst wenn man berücksichtigt, daß es sich bei manchen der kleineren Kopplungsgruppen um nicht-gekoppelte Teilstücke anderer Kopplungsgruppen handelt, fällt auf, daß sich in den beiden in dieser Arbeit vorgestellten Kopplungskarten eine relativ starke Ungleichverteilung der Marker auf den verschiedenen Chromosomen findet. Während in manchen Kopplungsgruppen lediglich drei Markerloci kartiert werden konnten, weisen andere Kopplungsgruppen bis zu 22 Markerloci auf. Ein ähnliches Verhalten läßt sich in der Kopplungskarte von SPIELMEYER et al. (1998 b) beobachten. Hier ist diese Ungleichverteilung allerdings nicht so stark ausgeprägt, da wesentlich mehr Marker kartiert wurden.

Die naheliegendste, triviale Erklärung für diese Ungleichverteilung ist eine unterschiedliche Größe der Chromosomen beim Lein. Auf kleineren Chromosomen werden naturgemäß weniger Marker detektiert als auf größeren.

KEIM et al. (1997) führten eine Ungleichverteilung von Markerloci auf die physikalische Struktur des Template-Chromosoms zurück. So ist bekannt, daß RFLP-Loci in Abhängigkeit zu den eingesetzten Restriktionsendonucleasen stehen, welche wiederum abhängig sind von den chemischen Strukturen in der chromosomalen Struktur, wie z.B. Methylierungen. Ein gleiches Verhalten postulierten KEIM et al. (1997) auch für AFLP-Marker. AFLP-Marker auf Basis des *EcoRI/MseI*-Systems sollten sich dementsprechend als unempfindlicher gegenüber Methylierungen zeigen als solche, die auf der Basis *PstI/MseI* funktionieren. KEIM et al. folgerten daraus ein dichteres Auftreten von AFLP-Markern auf *EcoRI/MseI* Basis im Bereich methylierter DNA. Allerdings beobachteten SPIELMEYER et al. (1998 b) im Vergleich der beiden Enzymsysteme keine signifikanten Unterschiede bei der Verteilung der Markerloci. Auch in den

in dieser Arbeit durchgeführten Kartierungen zeigten sich keine Hinweise für ein derartiges Verhalten.

Auch mit anderen Markersystemen, wie z.B. RFLP-Markern, läßt sich eine solche Ungleichverteilung der Marker in den Kopplungsgruppen beobachten, so daß mehr Kopplungsgruppen als Chromosomen vorhanden berechnet werden. Gleichzeitig treten auch sehr kleine Kopplungsgruppen mit teilweise nur zwei gekoppelten Markern auf (z.B. GENTZBITTEL et al. 1995).

Auf der Kopplungskarte der Population I [Szegedi62 x Atalante] konnten 139 Markerloci kartiert werden. Der mittlere Markerabstand ist mit 6,9 cM relativ gering. Insgesamt umfaßt diese Kopplungskarte 956,1 cM. Im Vergleich dazu steht die Kopplungskarte der Population II. Auf ihr wurden mit 118 etwas weniger Markerloci detektiert. Allerdings zeigte sich bei dieser Analyse mit 6,4 cM ein ähnlicher Kopplungsabstand. Zusammen resultiert daraus eine deutlich kleinere Kartengröße. Mit 758,2 cM umfaßt die Karte der Population II nur etwa 80% der Karte von Population I. Die Kopplungskarte von SPIELMEYER et al. (1998 b) ist mit 1372 cM wesentlich größer. Betrachtet man den mittleren Kopplungsabstand aller kartierten Marker, so ergibt sich mit 6,4 cM ein nahezu identischer Wert zu den mittleren Kopplungsabständen der Kopplungskarten der Population I und II.

SPIELMEYER et al. (1998 b) beobachten eine schwache Clusterung einzelner AFLP-Marker. Dadurch weicht die Anzahl der detektierten Loci erheblich von der Anzahl der kartierten Marker ab. Insgesamt konnten SPIELMEYER et al. 137 verschiedene Loci kartieren, das entspricht einem mittleren Abstand von 10,0 cM zwischen den einzelnen Markerloci. Eine Clusterung von Markern wurde weder bei der Population I noch bei der Population II gefunden. Population II weist allerdings Bereiche mit einer hohen Markerdichte auf, so z.B. auf Kopplungsgruppe VM-3. Allerdings wurden zwischen den betreffenden Markerloci immer noch Rekombinationen beobachtet, wenngleich die Rekombinationsfrequenzen mit 1 und 2 cM relativ gering ausfielen.

Untersuchungen im Weizen zeigten, daß sich in der Umgebung der Centromere häufig eine Clusterung der molekularen Marker beobachten läßt (CHAO et al. 1989, DEVOS et al. 1992, HART 1994). Dieses läßt sich eventuell darauf zurückführen, daß Crossing-over-Ereignisse in der Umgebung der Centromere deutlich seltener auftreten (TANKSLEY et al. 1992, LUCKASZEWSKI & CURTIS 1993, FRARY et al. 1996). Dieses

hätte bei einer Zufallsverteilung der Markerloci zur Folge, daß die Rekombinationsfrequenzen bei gleichen physikalischen Abständen im Bereich der Centromere kleiner ausfallen als in den übrigen Bereichen eines Chromosoms. Marker würden daher in diesen Bereichen geclustert auftreten. Ein ähnliches Verhalten von molekularen Markern wird für die Telomer-Region von Chromosomen vermutet (TANKSLEY et al. 1992).

Experimentell wurde eine Clusterung von Markern in der Centromer-Region auch für die Gerste (QI et al. 1996, QI et al. 1998) und bei der Tomate (TANKSLEY et al. 1992) beobachtet. Jedoch scheint eine Markerclusterung an den Centromeren nicht obligatorisch zu sein. Bei Genomkartierungen der Zuckerrübe (SCHONDELMAIER et al. 1996), der Linse (EUJAYL et al. 1998), der Kartoffel (VAN ECK et al. 1995) und bei der Sojabohne (KEIM et al. 1997) konnte eine Clusterung nicht oder nur für einzelne Chromosomen beobachtet werden. Die Ergebnisse der Genomanalysen des Leins fügen sich in dieses Bild widerspruchlos ein.

Eine Clusterung wurde sowohl für RFLP- als auch für AFLP-Marker festgestellt. Jedoch scheinen AFLP-Marker eher zur Clusterung zu neigen (QI et al. 1998). Aufgrund der hohen Empfindlichkeit der AFLP-Technik wird vermutet, daß leicht Variationen von repetitiver DNA, sowohl 1 bp-Insertionen bzw. Deletionen als auch Variationen in der Länge dieser Bereiche, durch die AFLP-Marker detektiert werden. Da gerade in Pflanzen mit einem relativ großen Genom, wie z.B. der Gerste, repetitive Sequenzen häufig im Bereich der Centromere auftreten, sollte in diesem Bereich eine Clusterung von AFLP-Markern häufiger erfolgen (QI et al. 1998). Diese Vermutung würde den Befunden dieser Arbeit nicht widersprechen. Aufgrund der ISSR-Analysen ist zu vermuten, daß repetitive Sequenzen im Lein, nicht zuletzt wegen dessen relativ kleinen Genomes, nur vergleichsweise selten vorkommen. Daher müßte eine Clusterung von AFLP-Markern wenn überhaupt, dann ebenfalls nur selten zu beobachten sein.

#### **4.2.3 Die Kartierung von monogenen Eigenschaften**

Anhand der Bonitur der Samenfarbe konnte in der Population I [Szegedi62 x Atalante] diese als phänotypischer Marker kartiert werden. Dieser Marker weist eine Koppelung zu den AFLP-Markern ACT/CTT-112 und AAC/CTC-259 mit 3,8 cM bzw. 15,7 cM auf.

Aufgrund der von THAMMES (1930) beobachteten Auswirkungen der Gene B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, C, D sowie E auf die Petalenfarbe muß die blaue Farbe der Blütenkronblätter der verwendeten homozygoten Sorten McGregor-E1747, Viking, Atalante und Szegedi62 durch die Merkmalskombination B<sub>1</sub>B<sub>1</sub> B<sub>2</sub>B<sub>2</sub> CC DD FF bestimmt sein. Szegedi62 besitzt gelben Samen, besitzt also das rezessive Allelpaar gg, während Atalante, Viking und McGregor wegen ihres braunen Samens über das dominante Allelpaar GG verfügen müssen. Eine Rekombination bezüglich der Samenfarbe wird nur für Population I erwartet und müßte sich daher als Monogen für den Genlocus Gg auch kartieren lassen. Eine Variation in der Blütenfarbe sollte in beiden Populationen unterbleiben und wurde auch nicht beobachtet. In dieser Arbeit wird daher die Samenfarbe als phänotypischer Marker für den Genlocus Gg gewertet.

GROTH et al. (1970) untersuchten ebenfalls die genetische Regulation der Samenfarbe bei Lein. Sie führen die Samenfarbe nur auf drei unabhängige Loci, nämlich B1, G und D zurück. Die gelbe Samenform tritt auf, sobald eines dieser Gene als rezessives Allel homozygot vorliegt. Allerdings treffen GROTH et al. keinerlei Aussagen über die Kombinationswirkung dieser Gene oder über deren Einfluß auf die Petalenfarbe. Nach THAMMES (1930) kommt es aber gerade auf die Wechselwirkung zwischen den einzelnen Genen an, die unterschiedliche Phänotypvariationen zur Folge haben. Außerdem machen GROTH et al. keine Angaben über den genetischen Hintergrund der verwendeten NI-Linien, so daß pleiotrope Effekte vermutlich unberücksichtigt blieben.

**Tab. 41:** Übersicht über AFLP-Marker, welche zu dem Gen Gg eine Rekombinationsfrequenz kleiner als 30 cM aufweisen.

AFLP-Marker	Kartierung in der Konsensus-Karte	Kartierung in der Population I	Δ
AGT/CTG-256	28,5	28,0	+0,5
AGC/CTG-257	25,6	24,8	+0,8
AGT/CTG-278	22,8	19,5	+3,3
AGC/CTG-279	20,6	23,4	-2,8
ACT/CGA-108	11,4	10,6	+0,8
ACT/CTT-112	4,3	3,8	+0,5
AAC/CTC-456	1,5	54,3	-52,8
<u>Gg</u>	0,0	0,0	0,0
AGG/CTT-336	3,4	28,4	-25,0
ACC/CTA-105	21,4	19,6	+1,8
AAC/CTC-259	23,7	15,7	+8,0
AAC/CTC-258	26,1	17,2	+8,9

Die Abstände der einzelnen Marker sind in cM bezogen auf die Position des Gens Gg angegeben.

SPIELMEYER et al. (1998 b) kartierten ebenfalls die Samenfarbe als *scol*. Obwohl keine Aussagen über den genetischen Hintergrund der Linien getroffen werden, ist es wahrscheinlich, daß die Variation der Samenfarbe auch in diesem Fall von dem Gen Gg abhängig ist. Die Samenfarbe kartiert in einer kleineren Kopplungsgruppe (16) im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit am Rand. Auch weist dieser Genlocus zu dem gekoppelten AFLP-Marker afH8s mit 5,4 cM eine losere Kopplung auf.

Die Berechnung der kombinierten Kopplungsgruppe KKG-1 aus den Kopplungsgruppen SA-2, VM-2 und VM-17 lokalisierte mehrere Marker in unmittelbarer Nähe zu dem Locus Gg (Tab. 41).

Die zu dem Gen Gg gekoppelten Marker kartierten in der Konsensus-Karte ähnlich wie in der Karte der Population I. Die Abstände der einzelnen Marker variierte dabei leicht. Allerdings konnten zwei zusätzliche AFLP-Marker, AAC/CTC-456 und AGG/CTT-336, durch die Berechnung der Konsensus-Karte in unmittelbarer Nähe zu dem Gen Gg kartiert werden.

#### **4.2.4 Möglichkeiten zur Berechnung einer Konsensus-Kopplungskarte**

Wenn AFLP-Marker, welche auf demselben Enzym-Primer-System beruhen, ein Fragment gleicher Basenlänge amplifizieren, so detektieren sie identische Loci (ALONSO et al. 1998). Das AFLP-System besitzt eine hohe Genauigkeit: Selbst wenn sich die von einer Enzym/Primer-Kombination amplifizierten Fragmente lediglich um ein Basenpaar unterscheiden, ist davon auszugehen, daß dadurch zwei unterschiedliche Loci detektiert wurden (QI et al. 1998).

In dieser Arbeit wurden zwei Kopplungskarten für den Kulturlein erstellt. Allerdings amplifizierten nur relativ wenige Enzym/Primerkombinationen in der zweiten Population die gleichen polymorphen Fragmente wie in der Population I. Lediglich 16,5% aller in der Population I kartierten Markerloci konnten auch für die zweite Population kartiert werden. Alle diese Markerloci ließen sich ebenfalls Kopplungsgruppen der Population II zuordnen. Dabei konnten insgesamt sieben Kopplungsgruppen der Population I mit 10 Kopplungsgruppen der Population II korreliert werden.

Voraussetzung für eine Berechnung einer gemeinsamen Konsensuskarte aus den Kopplungskarten zweier Populationen ist die Kartierung mindestens zweier, in beiden Populationen polymorpher Markerloci pro Kopplungsgruppe (WEBER et al. 1999). Dieses war bei mehreren Kopplungsgruppen gegeben, so daß insgesamt vier Konsensus-Kopplungsgruppen berechnet werden konnten. Diese umfaßten in erster Li-

nie die größeren Kopplungsgruppen beider Populationen. Mit der Anzahl der auf einer Kopplungsgruppe kartierten Marker variiert natürlich auch die Wahrscheinlichkeit, daß einer dieser Marker polymorph in einer anderen Population ist. Daher ist es naturgemäß relativ schwer in kleineren Kopplungsgruppen übertragbare Marker zu finden.

Auf eine ähnliche Problematik stießen WEBER et al. (1999) bei der Zuckerrübe. Im Vergleich von drei Kartierungspopulationen konnten trotz einer größeren Anzahl detektierter AFLP- und RFLP- Marker nur jeweils 1 bis maximal 5 übertragbare Marker je Chromosom gefunden werden. Dieses liegt wahrscheinlich in erster Linie an der hohen Sensitivität der AFLP-Technik. RFLP-Marker scheinen aufgrund ihrer geringeren Sensitivität besser zwischen verschiedenen Populationen übertragbar zu sein. Eine höhere Anzahl übertragbarer Marker läßt sich außerdem durch die Verwendung mehrerer Populationen erreichen (BÖRNER & KORZUN 1998). Die Erstellung zweier Kartierungspopulationen mit einem gemeinsamen Elter erhöht gleichfalls die Wahrscheinlichkeit zwischen den Populationen übertragbare Marker zu finden (DUFOUR et al. 1997).

Die Berechnung der Konsensuskarte zeigte, daß durch die Verwendung zweier Populationen die Dichte der kartierten Markerloci erheblich gesteigert werden kann. Im Mittel war der mittlere Markerloci-Abstand um ein Drittel kleiner als die der einzelnen Populations-Kopplungskarten (Tab. 42).

**Tab. 42:** Die Auflösung der einzelnen Kopplungskarten im Vergleich mit der Auflösung der Konsensuskarte.

Pop. I: Sz x At		Pop. II: Vi x MG		Konsensuskarte	
Kopplungsgruppe	cM/Locus	Kopplungsgruppe	cM/Locus	Kopplungsgruppe	cM/Locus
SA-2	6,0	VM-2	7,2	KKG-1	4,3
		VM-17	4,1		
SA-4	7,3	VM-1	6,5	KKG-2	4,6
SA-6	7,4	VM-4	3,5	KKG-3	3,2
SA-7	4,5	VM-5	10,1	KKG-4	3,7
<b>Mittelwert</b>	<b>6,3</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>6,0</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>4,0</b>

Angegeben ist jeweils der mittlere Markerabstand in cM für die Konsensuskopplungsgruppen sowie für die Kopplungsgruppen der Kartierungspopulationen. Der Mittelwert bezieht sich auf den mittleren Markerabstand für alle in dieser Population kartierten Marker.

Ein weiterer Vorteil von Konsensuskarten liegt darin, daß für ihre Erstellung ein größerer genetischer Hintergrund genutzt wurde. Dadurch wird eine Konsensuskarte für ein wesentlich größeres Spektrum von Populationen nutzbar. In die Konsensus-

karte dieser Arbeit sind sowohl Öl- als auch Faserleinsorten integriert, moderne Mutationslinien ebenso wie traditionelle Kultursorten. Diese Konsensuskarte stellt einen ersten Schritt für die Erstellung einer hochauflösenden, alle Chromosomen abdeckenden Kopplungskarte dar. Anhand einer solchen Referenzkarte ist eine zuverlässige Kartierung phänotypischer Eigenschaften auch in verschiedenen genetischen Hintergründen möglich. Für agronomisch-bedeutsame Merkmale können anhand einer solchen Referenzkarte enggekoppelte molekulare Marker evaluiert sowie eine Feinkartierung der entsprechenden Genombereiche durchgeführt werden.

#### **4.2.5 Die Effektivität der verschiedenen Markertechniken**

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene PCR-gestützte Markersysteme, nämlich AFLPs, RAPDs und, in wesentlich geringerem Umfang, auch ISSRs, zur Kartierung der Population I [Szegedi62 x Atalante] verwendet. Allerdings waren diese Markersysteme nicht alle in dem selben Maße für die Detektion polymorpher Loci geeignet. So amplifizierten lediglich 15,8% der RAPD-Primer polymorphe Fragmente. Noch niedriger war die Wahrscheinlichkeit, polymorphe Fragmente zu amplifizieren, bei den ISSR-Primern, wo nur 8,7% aller getesteten Primer polymorphe Bandenmuster erzeugten. Der geringe Polymorphiegrad beider Markersysteme liegt wahrscheinlich in erster Linie an der relativ geringen genetischen Diversität innerhalb der Population I [Szegedi62 x Atalante]. Bei den ISSR-Markern kommt hinzu, daß diese Markerklasse von der Häufigkeit und der Variabilität repetitiver Sequenzen abhängig ist. Eventuell sind diese Ergebnisse ein Indiz für eine geringe Häufigkeit von repetitiver Sequenzen im Lein-Genom.

Vergleichende Untersuchungen zwischen der RAPD und der ISSR-Technik beim Einkorn (*Triticum monococcum* L.) ergaben, daß eine Detektion von Polymorphismen bei der ISSR-Technik wesentlich häufiger erfolgt (NAGAOKA & OGIHARA 1997, KOJIMA et al. 1998). 33% aller verwendeten ISSR-Primer amplifizierten Polymorphismen. Dagegen detektierten nur 13% der verwendeten RAPD-Primer polymorphe Loci. Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, daß es sich bei der untersuchten Population um eine interspezifische Kreuzung der Arten *Triticum monococcum* und *T. boeoticum* subsp. *boeoticum* handelte. Daher wird zum einen die genetische Diversität in dieser Population im Vergleich zu den in dieser Arbeit verwendeten Lein-Populationen relativ groß gewesen sein, so daß ein höherer Polymorphiegrad der ISSR-Primer zu er-



warten war. Zum anderen besitzt das Genom von *Triticum spec.* wahrscheinlich mehr repetitive Sequenzen als das des Leins.

Im Vergleich dazu detektiert die AFLP-Technik eine wesentlich größere Anzahl polymorpher Loci, nämlich ca. 5-10 pro Einzelreaktion. Dieses liegt in erster Linie an der wesentlich höheren Zahl amplifizierter Fragmente je Einzelreaktion (ca. zwanzigmal mehr als bei der ISSR- bzw. RAPD-Technik).

Auffällig ist, daß die detektierten ISSR-Marker keine gestörte Segregation zeigten. KOJIMA et al. (1998) beobachtete ebenfalls eine nahezu ideale Spaltung der ISSR-Marker: 90% entsprachen hier der erwarteten Verteilung. Im Vergleich dazu liegt bei den RAPD-Markern mit 37,5% ein wesentlich höherer Anteil an Markern mit gestörter Segregation vor. Ähnliche Verhältnisse lassen sich bei den AFLP-Markern beobachten. Der Großteil der RAPD- und ISSR-Marker ließen sich gleichmäßig in die AFLP-Karte integrieren. Allerdings ließen sich, trotz idealer Spaltungsverhältnisse, 25% der ISSR-Marker nicht kartieren und blieben ungekoppelt. Hierbei ist zu beachten, daß insgesamt nur sehr wenig ISSR-Loci betrachtet wurden. Wesentlich höhere Anteile ungekoppelter ISSR-Marker fanden KOJIMA et al. (1998). Lediglich 20% aller detektierten ISSR-Loci ließen sich auf einer RFLP-Karte integrieren. Über eine bessere Kartierfähigkeit verfügen die RAPD-Marker. 88% aller detektierten RAPD-Marker konnten kartiert werden. Die weitaus beste Kartierbarkeit zeigten jedoch die AFLP-Marker. Lediglich 8% blieben ungekoppelt. Die Fähigkeit eines Markers kartiert zu werden scheint also bei allen Markertypen unabhängig von der Segregation zu sein.

Bei allen in dieser Arbeit verwendeten Markertechniken handelt es sich um Systeme, welche in erster Linie dominant/rezessive Allelverteilungen detektieren. Für eine Auswertung kodominanter Allele sind diese Markertechniken, mit Ausnahme vielleicht der AFLP-Technik, im Gegensatz zu der RFLP-Technik und der Mikrosatelliten-Technik, nicht geeignet. Da es sich aber bei den analysierten Populationen um RI-Populationen handelte, wäre eine Analyse heterozygoter Allele generell nicht möglich gewesen, so daß RFLP- und Mikrosatelliten-Markerloci ebenfalls nur eine dominant/rezessive Verteilung detektiert hätten. Ein Informationsgewinn bei einer zusätzlichen Verwendung dieser Techniken wäre daher nicht unbedingt gegeben gewesen.

Ein weiterer Vorteil der PCR-gestützten Markersystem gegenüber der RFLP-Technik liegt darin, daß nur relativ wenig Template-DNA zur Analyse benötigt wird (ISSR, RAPD: 20 ng/Reaktion; AFLP: 200-500 ng/Reaktion; RFLP: 2-10 µg/Blot). Hinzu kommt, daß die Entwicklung geeigneter Mikrosatelliten und RFLP-Sonden mit einem hohen Arbeits- und Kostenaufwand verbunden ist. Demgegenüber sind anonyme Markersysteme wie AFLPs, RAPDs und ISSRs ohne größere Vorarbeiten praktisch sofort anwendbar. Die AFLP-Technik benötigt im Vergleich zu RAPDs und ISSRs aufgrund der Fragmentauftrennung via Polyacrylamidgel einen etwas höheren Arbeits- und Materialaufwand, bietet aber einen wesentlich höheren Informationsgewinn. Zudem ist die AFLP-Technik automatisierbar, so daß sie das Mittel der Wahl darstellt um in relativ kurzer Zeit umfassende Genomkartierungen durchzuführen.

### 4.3 QTL-Analysen bei *Linum usitatissimum* L.

#### 4.3.1 Die züchterische Bedeutung der Regulation der Fettsäure-Biosynthese

Die Biosynthese der Fettsäuren ist ein essentieller Teil des pflanzlichen Primärstoffwechsels. Desweiteren dienen Fettsäuren als Substrat für die Produktion von Phytohormonen ebenso wie zur Synthese von Bestandteilen der zellulären Sekundärwände wie Wachsen, Cutinen oder Suberinen. Während die Biochemie dieses Stoffwechselweges gut charakterisiert ist, ist die Regulation der Fettsäure-Synthese jedoch noch relativ unverstanden, insbesondere im Vergleich zu anderen Biosynthesewegen, wie z.B. dem Kohlenhydratstoffwechsel (OHLROGGE & JAWORSKI 1997).

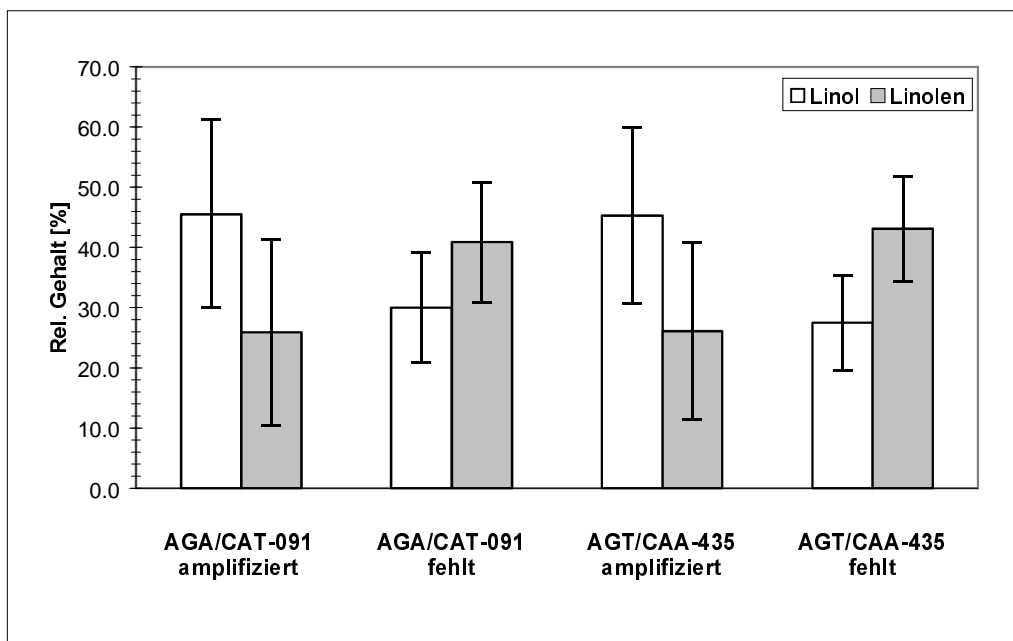
Von besonderem pflanzenzüchterischem Interesse ist die Fettsäure-Biosynthese im Zusammenhang mit der Produktion von Speicherstoffen (Pflanzenölen). Wie schon eingangs erwähnt, bilden pflanzliche Öle einen wertvollen Grundstoff für die Produktion verschiedenster industrieller Öle und Ölprodukte (DAMBROTH & BRAMM 1992). Ein Verständnis der genetischen Regulation der Fettsäuresynthese würde die Möglichkeit zur Etablierung einer markergestützten Selektion (*marker assisted selection*) zur Züchtung von ertragreicheren Ölpflanzensorten eröffnen. Gleichfalls könnte mittels der markergestützten Selektion eine Modifikation in der Zusammensetzung der Fettsäureanteile innerhalb der Pflanzenöle in Hinblick auf die spätere industrielle Nutzung erreicht werden.

Palmitinsäure (C<sub>16:0</sub>), Stearinsäure (C<sub>18:0</sub>), Ölsäure (C<sub>18:1</sub>), Linolsäure (C<sub>18:2</sub>) und Linolensäure (C<sub>18:3</sub>) stellen verschiedene Zwischen- und zum Teil auch Endprodukte der Fettsäure-Biosynthese dar (Abb. 2), deren Synthese unterschiedlich eng miteinander verknüpft ist. Über die Bestimmung der Anteile der einzelnen Fettsäuren im Samenöl können Regulatorgene für die einzelnen Zwischenstufen der Fettsäuresynthese mittels einer QTL-Analyse auf einer molekularen Kopplungskarte lokalisiert werden (THORMANN et al. 1996, SOMERS et al. 1998).

#### 4.3.2 Korrelation der Merkmale „Relativer Gehalt an Linol- und Linolensäure im Samenöl“

Eines der Zuchtziele für die Züchtung neuer Ölleinsorten ist die Modifikation des Linolensäure-Anteils (C<sub>18:3</sub>) im Leinöl (FRIEDT et al. 1992). Die Desaturierung der Linolsäure (C<sub>18:2</sub>) zu Linolensäure (C<sub>18:3</sub>) stellt die letzte Stufe in der Synthese ungesättigter Polyfettsäuren beim Lein dar. Daher sollten die Anteile beider Fettsäuren direkt miteinander negativ korreliert sein. Dieses konnte in beiden in

miteinander negativ korreliert sein. Dieses konnte in beiden in dieser Arbeit verwendeten Kartierungspopulationen nachgewiesen werden. Eine gleiche Korrelation wurde ebenfalls in früheren Arbeiten anderer Autoren beschrieben (GREEN 1986, ROWLAND 1990). Bezüglich der Frage nach der genetischen Regulation des einen Parameters muß daher immer auch der andere Parameter betrachtet werden, da beide Größen eng miteinander verknüpft sind („source-sink“-Verhältnis). Ein Faktor, welcher eine Zunahme des einen Parameters bewirkt, sollte gleichzeitig zu einer Erniedrigung des anderen Parameters führen.



**Abb. 24:** Co-Segregation der Merkmale „Relativer Gehalt an Linolsäure ( $C_{18:2}$ ) im Samenöl“ bzw. „Relativer Gehalt an Linolensäure ( $C_{18:3}$ ) im Samenöl“ mit den flankierenden Markern der QTLs  $C_{18:2-1}$  und  $C_{18:3-1}$ : AGA/CAT-091 und AGT/CAA-435.

In der Population II [Viking x McGregor-E1747] konnten mehrere Major-QTLs für den Gehalt an Linolensäure lokalisiert werden. Der einflußreichste QTL konnte auf Kopplungsgruppe VM-12 lokalisiert werden. Auf demselben Markerintervall konnte ebenfalls ein Major-QTL für den Gehalt an Linolsäure lokalisiert werden, welcher einen ähnlichen  $r^2$ -Wert, aber einen umgekehrten Effekt gleicher Größenordnung aufweist. Der Gehalt an Linol- bzw. Linolensäure zeigte eine deutliche Co-Segregation mit den flankierenden Markern dieses QTLs (Abb. 24).

Desweiteren wurden auf Kopplungsgruppe VM-1 zwei gekoppelte QTLs lokalisiert, welche zusammen zirka ein Viertel der phänotypischen Varianz in dem Gehalt an

Linolensäure erklären. Auf denselben Chromosomenabschnitten zeigte die LOD-Kurve ebenfalls Maxima für das Merkmal „Gehalt an Linolsäure“, allerdings lag das LOD-Maximum unter dem Grenzwert von 3,0.

Klassische Kreuzungsversuche an Mutationslinien vom Lein zeigten, daß der Gehalt an Linol- bzw. Linolensäure im wesentlichen von zwei Major-Genen, *Ln1* und *Ln2*, abhängig ist (GREEN 1986). Diese Gene sollten beide einen additiven Effekt besitzen und nicht miteinander gekoppelt sein. Wahrscheinlich wirken sich beide Gene direkt auf die Desaturierung des Linoyl-PCs zu Linolenyl-PC durch die Linoyl-Desaturase aus. ROWLAND (1990) führte die Änderung im Fettsäuremuster bei der EMS-Mutante McGregor-E1747 ebenfalls auf die Ausschaltung der Gene *Ln1* und *Ln2* zurück.

Es ist daher davon auszugehen, daß es sich bei dem QTL auf Kopplungsgruppe VM-12 um eines der *Ln*-Gene handelt. Wahrscheinlich ist auch, daß es sich bei den beiden gekoppelten QTLs auf Kopplungsgruppe VM-1 um das Äquivalent zu dem zweiten *Ln*-Gen handelt. Offen bleiben muß allerdings die Frage, ob es sich bei diesem *Ln*-Gen in Wirklichkeit um zwei gekoppelte einzelne Loci handelt, oder ob in diesem Falle eine fehlerhafte Markerverteilung auf der Kopplungskarte zu diesem Ergebnis führte.

Ein weiterer QTL, welcher auf Kopplungsgruppe VM-2 lokalisiert wurde, konnte nur für das Merkmal „Relativer Gehalt an Linolensäure im Samenöl“ gefunden werden. Dieser QTL weist allerdings einen wesentlich niedrigeren Anteil an der genotypischen Varianz auf als die zuvor beschriebenen QTLs. Es ist allerdings möglich, daß es sich bei diesem negativ wirkenden Locus um ein von dem Faserlein-Elter Viking stammendes Allel handelt, welches in Ölleinen generell nur in identischen Allelen vorliegt. Allerdings wird sowohl die Existenz von zusätzlich zu den Major-Genen *Ln1* und *Ln2* wirkenden Minor-Genen als auch die Existenz weiterer Major-Gene nicht ausgeschlossen (DAS & RHAH 1974, GREEN 1986).

Ähnliche QTL-Analysen der Linolensäure-Desaturierung wurden bislang nur bei dem Raps (*Brassica napus* L.) durchgeführt (JOURDEN et al. 1996, THORMANN et al. 1996, SOMERS et al. 1998). So analysierte SOMERS et al. (1998) 115 DH-Linien einer Kreuzung zwischen der EMS-Mutante Apollo und der Zuchtlinie YN90-1016. SOMERS et al. konnten insgesamt drei QTLs mit  $r^2$ -Werten von 32%, 14% und 5% lokalisieren. Dabei kartierte das *fad3*-Gen (ARONDEL et al. 1992) im Bereich des mittleren QTLs.

Diese Befunde ähneln den Ergebnissen der QTL-Analyse in der Population II [Viking x McGregor-E1747] stark. Insbesondere der unterschiedliche Einfluß der QTLs auf den Gehalt an Linolensäure ist auffällig und ein Indiz dafür, daß auch beim Lein die Majorgene *Ln1* und *Ln2* einen unterschiedlich großen Einfluß auf den Gehalt an Linolensäure besitzen.

#### **4.3.3 Korrelation der Merkmale „Relativer Gehalt an Palmitin-, Stearin- und Ölsäure im Samenöl“**

Palmitinsäure (C<sub>16:0</sub>), Stearinsäure (C<sub>18:0</sub>) und Ölsäure (C<sub>18:1</sub>) stellen aufeinanderfolgende Schritte in der Acyl-CoA-Synthese in den Plastiden dar (Abb. 2). Allerdings ist ein Transport der einzelnen Stoffe in das Cytoplasma in unterschiedlich großem Umfang möglich, so daß nicht zwingend eine enge Korrelation der Gehalte an den einzelnen Fettsäuren vorliegen muß. Gleichfalls kann sich auf den Gehalt an Ölsäure natürlich auch die Synthese von Linolsäure im Zuge des Kennedy-Weges auswirken. In der Population I [Szegedi62 x Atalante] sind die Gehalte der Fettsäuren Palmitinsäure, Stearinsäure und Ölsäure eng mit dem Gehalt des jeweils folgenden Syntheseproduktes korreliert. Eine schwächere Korrelation weist der Gehalt des ‚Endproduktes‘ Ölsäure mit dem des ‚Ausgangssubstrates‘ Palmitin auf. Insoweit konnte damit die enge Abhängigkeit dieser Biosyntheseprodukte voneinander bestätigt werden.

Für den Gehalt an Palmitinsäure wurden in dieser Population insgesamt 10 QTLs mit prozentualen  $r^2$ -Werten zwischen 2,1 und 17,4% lokalisiert. Diese hohe Anzahl ist damit zu erklären, daß bezüglich des Gehaltes an Palmitinsäure nicht nur dessen Umwandlung zu anderen Fettsäuren eine Rolle spielt, sondern auch die gesamten Acylierungsprozesse, welche zur Synthese dieser Fettsäure beitragen.

In demselben Markerintervall, in dem der einflußstärkste QTL lokalisiert werden konnte, konnte auch der einzige QTL für den relativen Gehalt an Ölsäure detektiert werden. Dieser pleiotrop wirkende QTL weist zudem eine enge Kopplung zu dem Gen G, welches an der Ausprägung der Samenfarbe beteiligt ist, auf.

Die Korrelation zwischen Samenfarbe und der pauschalen Ölqualität aufgrund pleiotroper Effekte ist schon länger bekannt (HOFFMANN 1985). Die enge Kopplung einzelner Parameter für das Fettsäuremuster und damit für die Ölqualität wurde durch die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt. Allerdings konnten für die Parameter Ölsäuregehalt und Linolsäuregehalt keine QTLs in Nähe des Gens G detektiert werden.

Für den relativen Gehalt an Stearinsäure konnte kein QTL lokalisiert werden. Da es sich bei dieser Kreuzung um eine Kreuzung zweier Ölleine handelt, und dieser Schritt einen essentiellen Bestandteil sowohl des Plastidenstoffwechsels als auch des gesamten Lipidstoffwechsels darstellt, ist es wahrscheinlich, daß beide Eltern über identische Allele für die Gene, die diesen Stoffwechselweg regulieren, verfügen.

Obwohl die Anteile der Fettsäuren Palmitinsäure, Stearinsäure und Ölsäure eng miteinander korreliert sind, läßt sich nur ein QTL lokalisieren, welcher pleiotrop auf diese verschiedenen Zwischenprodukte des Plastiden-Fettsäurestoffwechsels wirkt. Der pleiotrope Effekt könnte durch ein Gen hervorgerufen werden, welches direkt an den Einzelreaktionen beteiligt ist. In diesem Falle wäre dieses entweder ein Regulatorgen für die Expression der einzelnen Enzyme, eine Komponente eines Multienzymkomplexes oder aber ein Faktor bei der Modifikation/Regulation der Enzyme.

#### 4.3.4 Vergleich der beiden Populationen

Grundlage dieser Arbeit waren zwei unterschiedliche Kartierungspopulationen. Für Population I [Szegedi62 x Atalante] wurden als Kreuzungseltern zwei moderne Ölleinsorten verwendet, für Population II [Viking x McGregor-E1747] dagegen ein Faserlein und eine Ölleinmutante. Die Verwandtschaftsanalyse aller Kreuzungseltern zeigte, daß mit diesen Kreuzungseltern ein relativ großer Anteil der genetischen Diversität innerhalb der Kulturlein-Sorten abgedeckt wird. Dieses ist für die Bewertung der Ergebnisse der QTL-Analyse von erheblicher Bedeutung.

Allgemein sollte die Anzahl der lokalisierten QTLs mit der genetischen Diversität zwischen den Kreuzungseltern zunehmen. Um ein Maximum an QTLs zu detektieren, werden daher meistens solche Kreuzungseltern gewählt, welche möglichst große Unterschiede in den zu analysierenden Merkmalen und damit zugleich unterschiedliche Allele für diese Merkmale aufweisen (LANDER & BOTSTEIN 1989). Bezüglich der Merkmale „Relativer Gehalt an Linolsäure im Samenöl“ und „Relativer Gehalt an Linolensäure im Samenöl“ stellt Population II [Viking x McGregor-E1747] eine extrem hochspaltende Population aufgrund der Verwendung einer Mutationslinie als Kreuzungselter dar. Die in dieser Population kartierten QTLs repräsentieren daher solche Genloci, welche essentiell für diese Stoffwechselschritte sind (*Alles-oder-Nichts-Prinzip*). In der Pflanzenzüchtung können solche QTLs zur züchterischen Verbesserung von Linien genutzt werden, welche dieses Merkmal nicht oder nur in geringer

Ausprägung besitzen. In der Leinzüchtung wäre dieses gegenwärtig die Züchtung von Sorten mit einem äußerst niedrigen Linolensäureanteil im Leinöl.

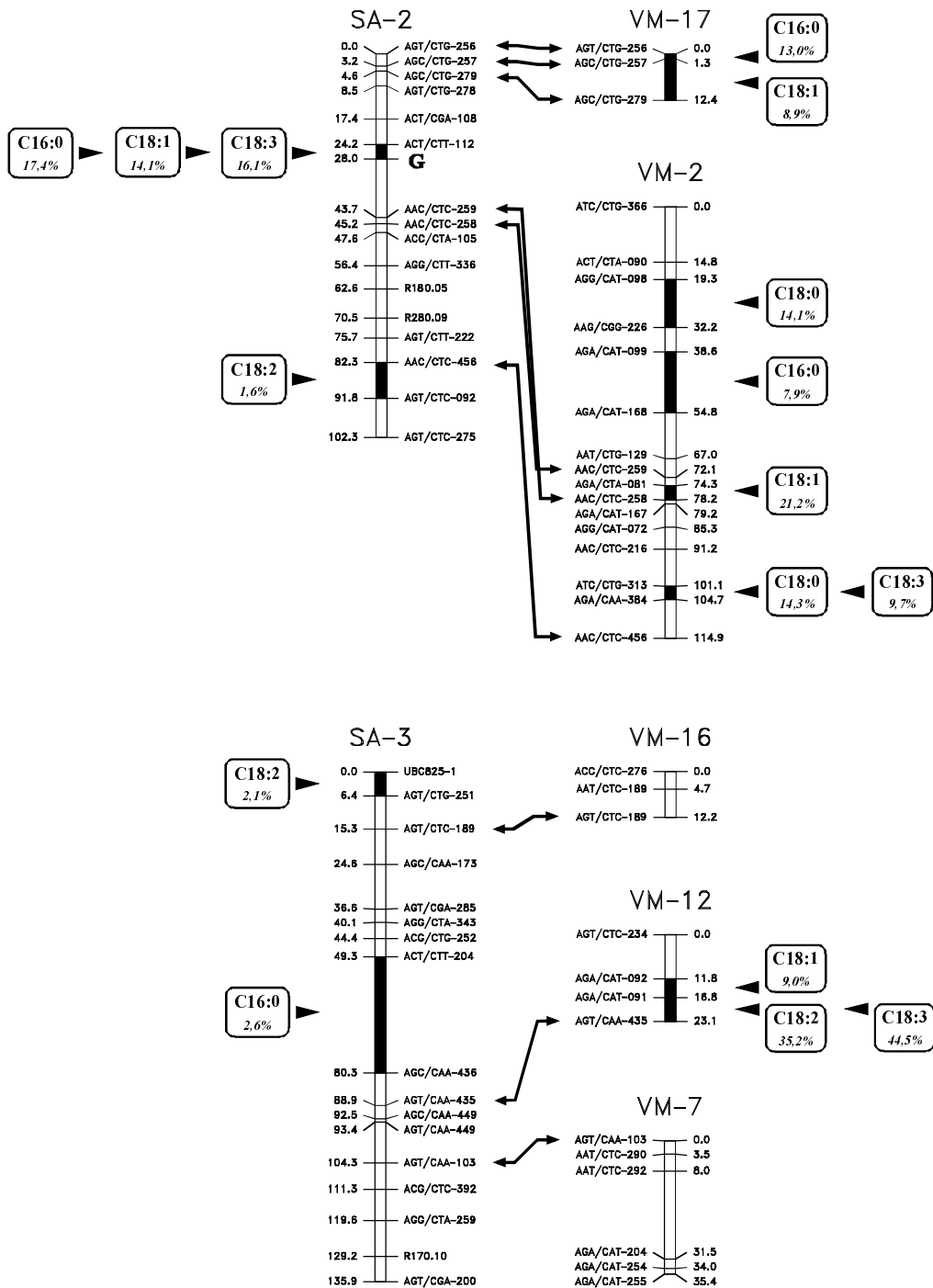
Unter züchterischen Gesichtspunkten ist es jedoch ebenso wichtig eine Steigerung bezüglich einzelner Ertragskomponenten zu erzielen. Dazu kann der oben beschriebene Versuchsansatz nur in den seltensten Fällen beitragen. Vielmehr ist es bei dieser Fragestellung sinnvoll, QTLs anhand von Kreuzungen aus konventionell-optimierten Sorten zu lokalisieren. In diesem Fall besteht die Möglichkeit, entweder neue, unterschiedlich wirkende Allele bekannter (Major-)Gene oder gänzlich neue (Minor-) Gene zu detektieren. Solche QTLs lassen sich dann für eine gezielte markergestützte Neukombination unterschiedlicher ertragsbeeinflussender Faktoren nutzen (Transgression). Bezüglich der Merkmale „Relativer Gehalt an Linolsäure im Samenöl“ und „Relativer Gehalt an Linolensäure im Samenöl“ ist daher die Population I [Szegedi62 x Atalante] besser zur Lokalisierung solcher QTLs geeignet. Transgressionseffekte für diese Merkmale wurden in beiden Populationen beobachtet (Tab. 31 und 40). Während in der Population II für das Merkmal „Relativer Gehalt an Linolensäure im Samenöl“ wie erwartet nur eine negative Transgression erzielt werden konnte, trat in der Population I eine starke positive Transgression auf.

Wie ein Vergleich der für die Merkmale „Relativer Gehalt an Linolensäure im Samenöl“ bzw. „Relativer Gehalt an Linolsäure im Samenöl“ lokalisierten QTLs zwischen den beiden Populationen zeigt, lassen sich die Major-QTLs C<sub>18:3</sub>-1 und C<sub>18:3</sub>-2 bzw. C<sub>18:3</sub>-3 auf Kopplungsgruppe VM-1 und VM-12 nicht direkt mit den entsprechenden QTLs in der Population I korrelieren (Abb. 25). Dieses stützt die Annahme, daß mittels der Population I keine essentiell-wirkenden Gene detektiert wurden.

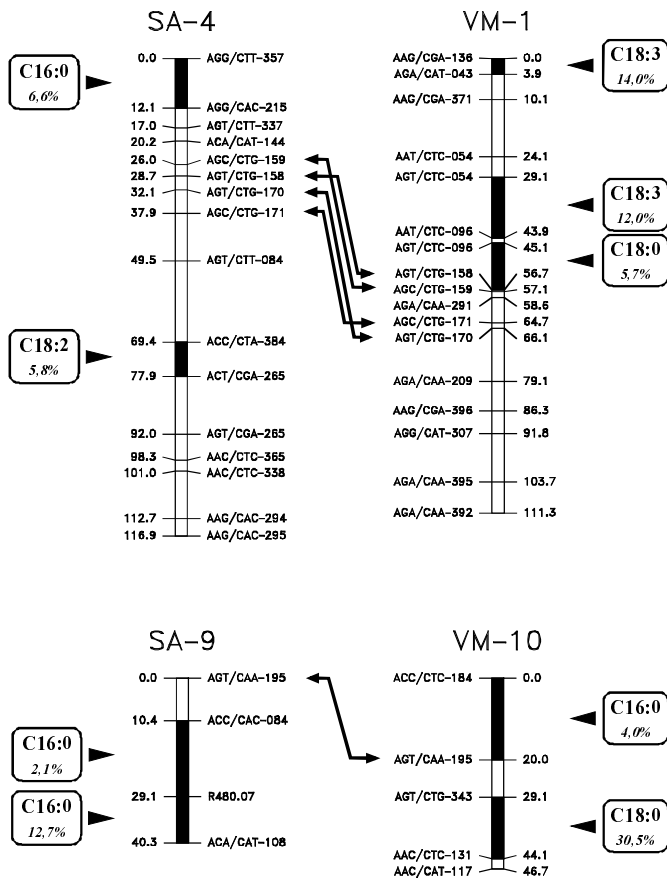
Bezüglich der Merkmale „Relativer Gehalt an Palmitinsäure im Samenöl“, „Relativer Gehalt an Stearinsäure im Samenöl“ und „Relativer Gehalt an Ölsäure im Samenöl“ besteht zwischen den beiden Populationen kein großer Unterschied hinsichtlich der Aussagekraft der lokalisierten QTLs. Da sich die Mutation der Linie McGregor-E1747 nur auf die vorher besprochenen Merkmale auswirkt, sollte die Population II einer Kreuzung zwischen einer normalen Ölleinsorte und einer Faserleinsorte entsprechen. Aufgrund der Diversitätsanalyse würde in diesem Zusammenhang die Population II sogar eine „engere“ Kreuzung darstellen als die Population I.



Auch die für diese Merkmale detektierten QTLs waren in beiden Populationen auf unterschiedlichen, nicht miteinander korrelierbaren Kopplungsgruppen lokalisiert (Abb. 25). Lediglich QTLs für das Merkmal „Relativer Gehalt an Palmitinsäure“ konnten in ähnlicher Weise auf den miteinander korrelierten Kopplungsgruppen SA-9 und VM-10 lokalisiert werden. Auffällig ist allerdings die Häufung vieler Major- und Minor-QTLs auf der Kopplungsgruppe SA-2 und deren wahrscheinliche Äquivalenzen, VM-2 und VM-17. Diese Kopplungsgruppe bzw. dieses Chromosom scheint allgemein einen hohen Anteil an der Regulation der Fettsäure-Biosynthese zu besitzen.



Erläuterung siehe Seite 121.



**Abb. 25:** Vergleich der lokalisierten QTLs zwischen den Populationen.

SA = Kopplungsgruppe der Population I: Szedi62 x Atalante

VM = Kopplungsgruppe der Population II: Viking x McGregor-E1747

Pfeile markieren zwischen den Populationen übertragbare Marker. Neben den Kopplungsgruppen sind die lokalisierten QTLs angegeben, in kursiver Schrift ist der jeweilige prozentuale r<sup>2</sup>-Wert wiedergegeben. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde bei der Summenformel auf eine Tieferstellung verzichtet.

### 4.3.5 Ausblick

In dieser Arbeit konnten eine Reihe von QTLs für verschiedene Fettsäureanteile im Leinöl in beiden kartierten Populationen lokalisiert werden (Übersicht: Tab. 43 und 44).

**Tab. 43:** Übersicht über alle lokalisierten QTLs für das Fettsäure-Muster im Leinöl in der Population I [Szegedi62 x Atalante].

Fettsäure	Summenformel	Anzahl der QTLs	Max. part. $r^2$	$r^2$ gesamt	LOD
Palmitinsäure	C <sub>16:0</sub>	10	17,4%	52,9% +/- 7,6%	13,22
Stearinsäure	C <sub>18:0</sub>	-	-	-	-
Ölsäure	C <sub>18:1</sub>	1	14,1%	14,1% +/- 7,1%	2,75
Linolsäure	C <sub>18:2</sub>	7	24,0%	43,8% +/- 8,3%	10,01
Linolensäure	C <sub>18:3</sub>	1	16,1%	16,1% +/- 7,4%	3,12

„Summenformel“ = reduzierte Summenformel mit der Anzahl der C-Atome sowie der Anzahl der ungesättigten C=C-Bindungen.

„Anzahl der QTLs“ = Anzahl aller für dieses Merkmal lokalisierten QTLs.

„Max. part.  $r^2$ “ = Anteil der phänotypischen Varianz, der durch den größten QTL erklärt wird.

„ $r^2$  gesamt“ = Anteil der phänotypischen Varianz, der durch alle lokalisierten QTLs erklärt wird.

„LOD“ = finaler LOD-Wert für alle lokalisierten QTLs.

**Tab. 44:** Übersicht über alle lokalisierten QTLs für das Fettsäure-Muster im Leinöl in der Population II [Viking x McGregor-E1747].

Fettsäure	Summenformel	Anzahl der QTLs	Max. part. $r^2$	$r^2$ gesamt	LOD
Palmitinsäure	C <sub>16:0</sub>	3	13,0%	22,1% +/- 7,9%	4,66
Stearinsäure	C <sub>18:0</sub>	5	30,5%	48,2% +/- 7,8%	12,27
Ölsäure	C <sub>18:1</sub>	3	21,2%	29,6% +/- 8,3%	6,56
Linolsäure	C <sub>18:2</sub>	1	35,2%	35,2% +/- 8,3%	8,09
Linolensäure	C <sub>18:3</sub>	4	44,5%	60,0% +/- 6,7%	17,1

Erläuterung siehe Tab. 43.

Es ist jedoch erforderlich, daß die Größe des Umwelteinflusses auf diese QTLs in wiederholten Feldversuchen evaluiert wird. Dadurch würde sich eine wesentlich genauere Aussage über die Wirkung und Signifikanz einzelner QTLs treffen lassen.

Für den Fettsäurestoffwechsel sind bereits einige Gene aus *Arabidopsis thaliana* L. (z.B. ARONDEL et al. 1992) bekannt. Es wäre zu überprüfen, inwieweit sich diese Gene auch im Lein lokalisieren lassen und ob sie in QTL-Bereichen kartieren.

Zur Nutzung der lokalisierten QTLs wäre es erforderlich, anhand der enggekoppelten Marker diagnostische STS- (*sequence tagged site*-) Marker zu entwickeln. Solche STS-Marker ließen sich für eine markergestützte Selektion effektiv nutzen. In diesem Zusammenhang könnte der Ausbau der Konsensuskarte weitere und neue enggekoppelte Marker liefern. Dadurch wäre die Nutzung der QTLs auch bei einem anderen genetischen Hintergrund möglich. Mittels der beobachteten Transgressionseffekte sollte die Züchtung neuer modifizierter Ölleinlinien allerdings auch direkt aus den in dieser Arbeit bereits analysierten RI-Linien möglich sein.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Genomanalyse des Kulturleins *Linum usitatissimum* L. mittels molekularer Markertechniken durchgeführt. Anwendung fanden dabei AFLP-, RAPD- und ISSR-Marker. Grundlage dieser Analyse waren zwei RI-Populationen, welche aus den Kreuzungen [Szegedi62 x Atalante] sowie [Viking x McGregor-E1747] entwickelt wurden. Diese Kopplungskarten bildeten die Grundlage für die Kartierung von QTLs für das Fettsäure-Muster im Leinöl mittels der „composite interval mapping“-Methode.

- Die genetische Diversität unter den Kreuzungseltern sowie innerhalb eines ausgewählten Sortiments von modernen Öl- und Faserleinkultursorten wurde ermittelt. Die Faserleinsorten erwiesen sich dabei als relativ eng verwandte Gruppe, während die Ölleinsorten größere genetische Distanzen aufwiesen.
- Für die Population I [Szegedi62 x Atalante] wurde eine molekulare Kopplungskarte erstellt. Diese Kopplungskarte umfaßt 139 Markerloci auf 16 Kopplungsgruppen bei einem mittleren Markerloci-Abstand von 6,9 cM.
- Für die Population II [Viking x McGregor-E1747] wurde ebenfalls eine molekulare Kopplungskarte entwickelt. Diese Karte besteht aus 118 AFLP-Markerloci, welche bei einem mittleren Markerloci-Abstand von 6,4 cM auf insgesamt 17 Kopplungsgruppen lokalisiert sind.
- Eine Clusterung von Markern wurde bei keiner Kopplungskarte beobachtet.
- Es konnten vier Konsensus-Kopplungsgruppen berechnet werden, welche zusammen 96 Markerloci umfassen. Der mittlere Markerloci-Abstand dieser Konsensuskarte beträgt 4,1 cM.
- Die Anteile der gesättigten Fettsäuren Palmitinsäure (C<sub>16:0</sub>) und Stearinsäure (C<sub>18:0</sub>) sowie der ungesättigten Fettsäuren Ölsäure (C<sub>18:1</sub>), Linolsäure (C<sub>18:2</sub>) und Linolensäure (C<sub>18:3</sub>) im Samenöl der RI-Linien beider Populationen wurden mittels gaschromatographischer Analysen ermittelt.
- Die Verteilung dieser Merkmale innerhalb der Populationen und deren Korrelation zueinander wurde untersucht. In beiden Populationen wurde eine Korrelation zwischen dem relativen Gehalt an Stearinsäure und dem relativen Gehalt an Ölsäure

beobachtet. Ebenso waren die relativen Anteile an Linolsäure und Linolensäure in beiden Populationen eng miteinander korreliert.

- Es konnten in beiden Populationen mehrere QTLs für das Fettsäuremuster im Leinöl kartiert werden. Eine Übersicht über alle lokalisierten QTLs wird in Tabelle 43 und 44 gegeben. Teilweise erklären die lokalisierten QTLs bis zu 60% der gesamten phänotypischen Varianz innerhalb eines Fettsäureanteils im Leinöl.
- In der Population II [Viking x McGregor-E1747] konnte eine Korrelation zwischen den QTLs für das Merkmal ‚Relativer Gehalt an Linolsäure im Samenöl‘ und dem Merkmal ‚Relativer Gehalt an Linolensäure im Samenöl‘ hergestellt werden.
- Transgressionen konnten für jedes Merkmal beobachtet werden. Desweiteren zeigten mehrere QTLs pleiotrope Effekte.

Die Etablierung molekularer Markertechniken und die Entwicklung molekularer Karten stellt den ersten Schritt für eine kartengestützte Klonierung (*map based cloning*) einzelner Gene dar. Durch die Lokalisierung von QTLs für das Fettsäuremuster lassen sich die in dieser Arbeit vorgestellten Kopplungskarten direkt für die Etablierung einer markergestützten Selektion in der Ölleinzüchtung nutzen. Die Verfügbarkeit von neuen, der industriellen Nutzung angepassten Ölleinsorten wiederum könnte zur Steigerung der Wirtschaftlichkeit des Leinanbaus beitragen.

## 6 ABSTRACT

The objective of this work was to analyze the genome of flax (*Linum usitatissimum* L.) using molecular marker techniques. For this purpose, AFLP-markers, RAPD- and ISSR-markers were chosen. Two recombinant inbred populations, derived from the crosses [Szegedi62 x Atalante] and [Viking x McGregor-E1747] were used for mapping. The resulted linkage maps were used then as a basis for mapping quantitative trait loci (QTLs) for the fatty acid pattern in the linseed oil via the composite interval mapping method.

- The genetic diversity of the parental lines of the RI-population as well as of a sortiment of modern fibre-flax and oilseed cultivars was estimated on molecular level using RAPD-markers. The results demonstrate a relatively close relationship among the fibre-flax cultivars. In contrast, the oilseed cultivars were characterized by larger genetic distances.
- For the RI-population I [Szegedi62 x Atalante], a molecular linkage map was calculated. This linkage map includes 139 marker loci located on 16 linkage groups with an average spacing of 6.9 cM.
- Another linkage map was calculated for the RI-population II [Viking x McGregor-E1747]. Here, 118 AFLP marker loci were mapped, which are coupled in 17 linkage groups with an average spacing of 6.4 cM.
- No clustering of markers was observed in any of the linkage maps.
- A consensus linkage map containing 4 consensus linkage groups was designed. The average spacing of loci in these linkage groups was 4.1 cM.
- The contents of the saturated fatty acids, palmitic acid (C<sub>16:0</sub>) and stearic acid (C<sub>18:0</sub>), as well as the contents of the unsaturated fatty acids, oleic acid (C<sub>18:1</sub>), linolic acid (C<sub>18:2</sub>) and linoleic acid (C<sub>18:3</sub>) in the seed oil, were estimated in both RI-populations by gas chromatography.
- The contribution of these traits in the RI-populations and the correlations with each other were analyzed. In both populations a significant correlation between the relative content of stearic acid and the relative content of oleic acid was observed. The same was found for the relative contents of linolic and linoleic acid.



- For all traits, several QTLs were estimated in both RI-populations. Some of these QTLs explain up to 60% of the total phenotypic variance in the respective fatty acid content.
- A correlation between the QTLs for the traits 'relative content of linolic acid in the seed oil' and 'relative content of linoleic acid in the seed oil' was observed in population II [Viking x McGregor-E1747].
- Both, positive as well as negative, transgression effects were detected for each trait. Furthermore, several QTLs showed pleiotropic effects concerning different traits.

The establishment of molecular marker techniques, and the development of molecular linkage maps is the first and unalterable step for the map based cloning of single genes. The localization and mapping of QTLs for the fatty acid pattern in the seed oil allows a direct application of the here presented linkage maps for marker assisted selection in linseed breeding. Furthermore, the availability of new oilseed cultivars, designed for the specific industrial demand, may allow an increased economy of flax cultivation.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

### A

- ALONSO BC, PEETERS AJM, KOORNNEEF M, LISTER C, DEAN C, VAN DEN BOSCH N, POT J, KUIPER MTR (1998): Development of an AFLP based linkage map of Ler, Col and Cvi *Arabidopsis thaliana* ecotypes and construction of a Ler/Cvi recombinant inbred line population. *Plant Journal* 14: 259-271.
- ARONDEL V, LEMIEUX B, HWANG B, GIBSON S, GOODMAN HM, SOMERVILLE CR (1992): Map-based cloning of a gene controlling omega-3 fatty acid desaturation in *Arabidopsis*. *Sci.* 258: 1353-1354.
- ASFAW Z (1989): Variation in hordein polypeptide pattern within ethiopian barley, *Hordeum vulgare* L. (Poaceae). *Hereditas* 110: 185-191.

### B

- BACKES G (1995): Lokalisierung wirtschaftlich wichtige, quantitativ vererbter Merkmale mit Hilfe von RFLP-Markern bei Gerste. Dissertation Technische Universität München. Aachen: Verlag Shaker; 1995.
- BACKHAUS K, ERICHSON B, PLINKE W, WEIBER R (1996): Multivariate Analysemethoden: Eine anwendungsorientierte Einführung. Berlin: Springer Verlag; 1996.
- BAILEY DW (1981): Recombinant inbred strains and bilineal congenic strains. In: Foster HJ, Small JD, Fox JG (Eds.): *The mouse in biomedical research*; Bd. 1. New York: Academic Press; 1981.
- BARAKAT MN, COCKING EC (1985): An assessment of the cultural capabilities of protoplasts of some wild species of *Linum*. *Plant Cell Rep.* 4: 164-167.
- BEARD BH, COMSTOCK VE (1965): Flax genetics and gene symbolism. *Crop Sci.* 5: 151-155.
- BECKER J, VOS P, KUIPER M, SALAMINI F, HEUN M (1995): Combined mapping of AFLP and RFLP markers in barley. *Mol. Gen. Genet.* 249: 65-73.
- BECKMANN JS, SOLLER M (1983): Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement: Methodologies, mapping and costs. *Theor. Appl. Genet.* 67: 601-611.
- BERNATSKY R, TANKSLEY SD (1986): Majority of random cDNA clones correspond to single loci in the tomato genome. *Mol. Gen. Genet.* 203: 8-14.
- BICKERT C (1994): Untersuchungen zur Züchtung von Öllein (*Linum usitatissimum* L.) mit Hilfe der Antherenkulturtechnik und der Pedigree-Selektion im Hinblick auf eine Nutzung als nachwachsender Rohstoff. Dissertation Universität Gießen.
- BÖRNER A, KORZUN V (1998): A consensus linkage map of rye (*Secale cereale* L.) including 374 RFLPs, 24 isoenzymes and 15 gene loci. *Theor. Appl. Genet.* 97:1279-1288.
- BOESEWINKEL FD (1980): Development of ovule and testa of *Linum usitatissimum* L. *Acta Bot. Nederl.* 29: 17-32.
- BOIVIN K, DEU M, RAMI JF, TROUCHE G, HAMMON P (1999): Towards a saturated sorghum map using RFLP and AFLP marker. *Theor. Appl. Genet.* 1999: 320-328.
- BRADSHAW JE, HACKETT CA, MEYER RC, MILBOURNE D, MCNICOL JW, PHILLIPS MS, WAUGH R (1998): Identification of AFLP and SSR markers associated with quantitative resistance to *Globodera pallida* (Stone) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) with a view to marker-assisted selection. *Theor. Appl. Genet.* 97: 202-210.
- BRAMM A, SEIDEWITZ L, RÜHL G (1990): Evaluierungsdaten zu *Linum usitatissimum* L. Braunschweig-Völkenrode: Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft Eigenverlag; 1990.
- BROWSE J, SOMERVILLE C (1991): Glycerolipid synthesis: biochemistry and regulation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 42: 467-506.

- BRETTING PK, WIDRLECHNER (1995): Genetic markers and plant genetic resource management. *Plant Breed. Rev.* 13: 11-86.
- BRIM CA (1966): A modified pedigree method of selection in soybeans. *Crop. Sci.* 6: 220.
- BUNCE NAC, FORDE BG, KREIS M, SHEWRY PR (1986): DNA restriction length polymorphism at hordein loci: Application to identifying and fingerprinting barley cultivars. *Seed Sci. Technol.* 14: 419-429.
- BURR B, BURR FA (1991): Recombinant inbreds for molecular mapping in maize. *Trends Genet.* 7: 55-60.
- BURR B, BURR FA, THOMPSON KH, ALBERTSON MC, STUBER CW (1988): Gene mapping with recombinant inbred lines in maize. *Genetics* 118: 519-526.

## C

- CAETANO-ANOLLES G, BASSAM BJ, GRESSHOF PM (1991): DNA amplification fingerprinting: A strategy for genome analysis. *Plant Mol. Biol. Rep.* 9: 294-307.
- CARBONELL EA, ASINS MJ, BASELGA M, BALANSARD E GERIG TM (1993): Power studies in the estimation of genetic parameters and the localization of quantitative trait loci for backcross and doubled haploid populations. *Theor. Appl. Genet.* 86: 411-416.
- CAPY P, BAZIN C, HIGUET D, LANGIN T (1998): Dynamics and evolution of transposable elements. Heidelberg: Springer-Verlag; 1998.
- CATO SA, CORBETT GE, RICHARDSON TE (1999): Evaluation of AFLP for genetic mapping in *Pinus radiata* D. Don.. *Mol. Breed.* 5: 275-281.
- CHAO S, SHARP PJ, WORLAND AJ, WARHAM EJ, KOEBNER RMD, GALE MD (1989): RFLP-based genetic maps of wheat homoeologous group-7 chromosomes. *Theor. Appl. Genet.* 78: 495-504.
- CHO YG, MCCOUCH SR, KUIPER M, KANG M-R, POT J, GROENEN JTM, EUN MY (1998): Integrated map of AFLP, SSLP and RFLP markers using a recombinant inbred population of rice (*Oryza sativa* L.) *Theor. Appl. Genet.* 97: 370-380.
- CONDIT R, HUBBELL SP (1991): Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genomes. *Genome* 34: 66-71.
- COWEN NM (1988): The use of replicated progenies in marker-based mapping of QTLs. *Theor. Appl. Genet.* 75: 857-862.
- CROSS RJ (1992): A proposed revision of the IBPGR barley descriptor list. *Theor. Appl. Genet.* 84: 501-507.
- CULBERTSON JO, COMSTOCK VE, FREDERIKSEN RA (1960): Further studies on the effect of seed coat color upon agronomic and chemical characters and seed injury in flax. *Agron. J.* 52: 210-212.
- CULBERTSON JO, KOMMEDAHL T (1956): The effect of seed coat color upon agronomic and chemical characters and seed injury in flax. *Agron. J.* 48: 25-28.
- CULLIS CA (1981): DNA sequence organisation in the flax genome. *Biochim. Biophys. Acta* 652: 1-15.

## D

- DAMBROTH M, BRAMM A (1992): Die Ertragsbildung von Öllein (*Linum usitatissimum* L.). In: Leinsamen als nachwachsender Rohstoff. Münster: Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten; 1992.
- DAMBROTH M, SEEHUBER R (1988): Flachs: Züchtung, Anbau und Verarbeitung. Stuttgart: Ulmer, 1988.
- DAS K, RAI M (1974): A diallel analysis of iodine value in linseed. *Indian J. Genet. Plant. Breed.* 34: 718-725.
- DE SIMONE M, MORGANTE M, LUCCHIN M, PARRINI P, MAROCCO A (1997): A first linkage map of *Cichorium intybus* L. using a one-way pseudo-testcross and PCR-derived markers. *Mol. Breeding* 3:415-425.

- DEVOS KM, ATKINSON MD, CHINOY CN, LIU CJ, GALE MD (1992): RFLP-based genetic map of the homoeologous group-3 chromosomes of wheat and rye. *Theor. Appl. Genet.* 83: 931-939.
- DICE, LR (1945): Measures of the amount of ecological association between species. *Ecology* 26: 297-302.
- DIEDERICHSEN A, HAMMER K. (1995): Variation of cultivated flax (*Linum usitatissimum* L. subsp. *usitatissimum*) and its wild progenitor pale flax (subsp. *angustifolium* (Huds.) Thell.). *Genetic Resources and Crop Evolution* 42: 263-272.
- DIJANA R, BERTHE T, BUREL C, SCHAUMANN A, BRUYANT P, BALANGE AP (1996): Partial purification and characterization of basic peroxidases from flax cell-culture medium. *Plant Physiol. Biochem.* 34: 771-778.
- DILLMANN AC (1953): Classification of flax varieties. Washington, D.C.: U.S. Dept. of Agric. Eigenverlag; Techn. Bull. Nr. 1064; 1953.
- DIRLEWANGER E, PRONIER V, PARVEY C, GUYE A, MONET R (1998): Genetic linkage map of peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) using morphological and molecular markers. *Theor. Appl. Genet.* 97: 888-895.
- DOLL H, BROWN AHD (1979): Hordein variation in wild (*Hordeum spontaneum*) and cultivated (*H. vulgare*) barley. *Can. J. Genet. Cytol.* 21: 391-404.
- DOLL H, JENSEN HP (1986): Localization of powdery mildew resistance gene *Ml-ra* on barley chromosome 5. *Hereditas* 105: 61-65.
- DOMONEY C, ELLIS THN, DAVIS DR (1986): Organization and mapping of legumin genes in *Pisum*. *Mol. Gen. Genet.* 202: 280-285.
- DUFOUR P, DEU M, GRIVET L, D'HONT A, PAULET F, BOUET A, LANAUD C, GLASZMANN JC, HAMON P (1997): Construction of a composite sorghum genome map and comparison with sugarcane, a related complex polyploid. *Theor. Appl. Genet.* 94: 409-418.

## E

- ECK HJ VAN, VAN DER VOORT JR, DRAAISTRA J, VAN ZANDVOORT P, VAN ENCKEVORT E, SEGERS B, PELEMAN J, JACOBSEN E, HELDER J, BAKKER J (1995): The inheritance and chromosomal localization of AFLP markers in a non-inbred potato offspring. *Mol. Breed.* 1: 397-410.
- EDWARDS MD, HENETJARIS T, WRIGHT S, STUBER CW (1992): Molecular-marker-facilitated investigations of quantitative trait loci in maize: IV. Analysis based on genome saturation with isozyme and restriction fragment length polymorphism markers. *Theor. Appl. Genet.* 83: 765-774.
- ELLIS THN (1986): Restriction fragment length polymorphism markers in relation to quantitative characters. *Theor. Appl. Genet.* 72:1-2.
- ELLIS JG, FINNEGAN EJ, LAWRENCE GJ (1992): Developing a transposon tagging system to isolate rust-resistance genes from flax. *Theor. Appl. Genet.* 85: 46-54.
- ELLIS J, LAWRENCE G, AYLIFFE M, ANDERSON P, COLLINS N, FINNEGAN J, FROST D, LUCK J, PRYOR T (1997): Advances in the molecular genetic analysis of the flax-flax rust interaction. *Annu. Rev. Phytopathol.* 35: 271-291.
- EIJAYL I, BAUM M, POWELL W, ERSKINE W, PEHU E (1998): A genetic linkage map of lentil (*Lens* sp.) based on RAPD and AFLP markers using recombinant inbred lines. *Theor. Appl. Genet.* 97: 83-89.
- EVANS CD, MCCONNELL DG, LIST GR, SCHOLFIELD CR (1969): Structure of unsaturated vegetable oil glycerides: direct calculation from fatty acid composition. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 46: 421-424.
- EVOLA SV, BURR FA, BURR B (1986): The suitability of restriction fragment length polymorphisms as genetic markers in maize. *Theor. Appl. Genet.* 71: 765-771.

**F**

- FALCONER DS (1984): Einführung in die quantitative Genetik. Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer; 1984.
- FANG DQ, ROOSE ML (1997): Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. *Theor. Appl. Genet.* 95: 408-417.
- FANG DQ, ROOSE ML, KRUEGER RR, FEDERICI CT (1997): Fingerprinting trifoliate orange germ plasm accessions with isozymes, RFLPs, and inter-simple repeat markers. *Theor. Appl. Genet.* 95: 211-219.
- FAWZI S (1980): Flax. In: The history of medicinal and aromatic plants (Proceedings of the Second International Congress, Alexandria, Egypt, Dec. 1980). Karachi: Hammad Foundation Press; 1980.
- FRARY A, PRESTING GG, TANKSLEY SD (1996): Molecular mapping of the centromeres of tomato chromosomes 7 and 9. *Mol. Gen. Genet.* 250: 295-304.
- FRIEDT W (1992): Grundlegende Aspekte der Züchtung von Öllein. In: Leinsamen als nachwachsender Rohstoff. Münster: Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten; 1992
- FRYDENBERG O, NIELSEN G, SANDFAER J (1969): The inheritance and distribution of  $\alpha$ -amylase types and DDT responses in barley. *Z. Pflanzenzüchtg.* 61: 201-215.

**G**

- GALE MD, ATKINSON MD, CHINOY CN, HARCOURT RL, JIU J, LI QY, DEVOS KM (1995): Genetic maps of hexaploid wheat. *Proc. 8<sup>th</sup> Int. Wheat Genet. Symp.* 1995: 29-40.
- GEBHARDT C, RITTER E, BARONE A, DEBENER T, WALKEMEIER B, SCHACHTSCHNABEL U, KAUFMANN H, THOMPSON RD, BONIERBALE MW, GANAL MW, TANKSLEY SD, SALAMINI F (1991): RFLP maps of potato and their alignment with the homoelogenous tomato genome. *Theor. Appl. Genet.* 83: 250-256.
- GELDERMANN H (1975): Investigations on inheritance of quantitative characters in animal by gene markers: I. Methods. *Theor. Appl. Genet.* 46: 319-330.
- GENTZBITTEL L, VEAR F, ZHANG Y-X, BERVILLÉ A, NICOLAS P (1995): Development of a consensus linkage RFLP map of cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theor. Appl. Genet.* 90:1079-1086.
- GILL KS, YERMANDOS DM (1967): Cytogenetic studies on the genus *Linum*. I Hybrids among taxa with 15 as the haploid chromosome number. *Crop Sci.* 7: 623-627.
- GILPIN BJ, MCCALLUM JA, FREW TJ, TIMMERMAN-VAUGHAN GM (1997): A linkage map of pea (*Pisum sativum* L.) genome containing cloned sequences of known function and expressed sequence tags (ESTs). *Theor. Appl. Genet.* 95: 1289-1299.
- GONZALES JM, FERRER E (1993): Random amplified polymorphic DNA analysis in *Hordeum* species. *Genome* 36: 1029-1031.
- GREEN AG (1983): Interspecific hybridisation in the genus *Linum*. In: Proceedings of the Australian Plantbreeding Conference. Adelaide: Eigenverlag; 1981.
- GREEN AG (1986): Genetic control of polyunsaturated fatty acid biosynthesis in flax (*Linum usitatissimum* L.) seed oil. *Theor. Appl. Genet.* 72: 654-661.
- GREEN AG, MARSHALL DR (1981): Variation for oil quantity and quality in linseed (*Linum usitatissimum*). *Austr. J. Agric. Res.* 32: 599-607.
- GROTH JV, COMSTOCK VE, ANDERSON NA (1970): Effect of seedcolor on tolerance of flax to seedling blight caused by *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 60: 379-380.
- GUPTA M, CHYI Y-S, ROMERO-SEVERSON J, OWEN JL (1994): Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theor. Appl. Genet.* 89: 998-1006.

**H**

- HALDANE JBS, WADDINGTON CH (1931): Inbreeding and linkage. *Genetics* 16: 357-374.
- HALEY CS, KNOTT SA (1992): A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. *Heredity* 69: 315-324.
- HAMADA H, PETRINO MCGREGOR-E1747, TAKUGANA T (1982): A novel repeated element with Z-DNA forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 6456-6469.
- HARLAN JR (1986): Plant domestication: Diffuse origins and diffusions. In: *The origin and domestication of cultivated plants*. Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo: Elsevier, 1986.
- HART GE (1994): RFLP maps of bread wheat. In: PHILLIPS RL, VASIL IK (Eds.): *DNA-based markers in plants*. Amsterdam: Kluwer Academic Publishers, 1994.
- HATZ B (1997): Untersuchungen der genetischen Diversität innerhalb der Gattung *Hordeum* mit molekularen Markertechniken. Dissertation Technische Universität München. München: Herbert Utz Verlag; 1997.
- HAUGE BM, HANLEY SM, CARTINHO S, CHERRY JM, GOODMAN HM, KOORNEEF M, STAM P, CHANG C, KEMPIN S, MEDRANO L (1993): An integrated genetic/RFLP map of the *Arabidopsis thaliana* genome. *Plant J.* 3: 745-754.
- HOFFMANN W (1961): Lein. in: ROEMER T, RUDOLF W (1961): *Handbuch der Pflanzenzüchtung*, Bd. 5. Berlin, Hamburg: Verlag Paul Parey 1961.
- HOFFMANN F, THOMAS E, WENZEL G (1982): Anther culture as a breeding tool in rape. *Theor. Appl. Genet.* 61: 225-232.
- HOFFMANN W, MUDRA A, PLARRE W (1985): *Lehrbuch der Züchtung landwirtschaftlicher Kulturpflanzen*. Berlin, Hamburg: Verlag Paul Parey; 1985.
- HSAM SLK, SCHICKLE H, WESTERMEIER R, ZELLER FJ (1993): Identification of cultivars of crop species by polyacrylamid electrophoresis: I. commercial barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars grown in germany. *Monatsschrift f. Brauwiss.* 46: 86-94.
- HU J, QUIROS C, ARNUS P, STRUSS D, ROBBELEN G (1995): Mapping of a gene determining linolenic acid concentration in rapeseed with DNA-based markers. *Theor. Appl. Genet.* 90: 258-262.
- HUNTER RL, MARKERT CL (1957): Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. *Science* 125: 1294-1295.

**J**

- JEFFREYS AJ, WILSON V, THEIN SL (1985): Hypervariable minisatellites regions in human DNA. *Nature* 314:67-73.
- JOHANNSEN W (1913): *Elemente der exakten Erblchkeitslehre*. Jena: Gustav Fischer Verlag; 2. Aufl. 1913.
- JOUREN C, BARRET P, HORVAIS R, DELOURME R, RENARD M (1996): Identification of RAPD markers linked to linolenic acid genes in rapeseed. *Euphytica* 90: 351-357.

**K**

- KANTEY RV, ZENG X, BENNETZEN JL, ZEHR BE (1995): Assessment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea mays* L.) inbred lines using inter-simple sequence repeats (ISSR) amplification. *Mol. Breed.* 1: 365-373.
- KEIM P, DIERS BW, OLSON TC, SHOEMAKER R (1990): RFLP mapping in Soybean: Association between marker loci and variation in quantitative traits. *Genetics* 126: 735-742.
- KEIM P, SCHUPP JM, TRAVIS SE, CLAYTON K, ZHU T, SHI L, FERREIRA A, WEBB DM (1997): A high-density soybean genetic map based on AFLP markers. *Crop Sci.* 37: 537-543.

- KNOTT SA, HALEY CS (1992): Maximum likelihood methods for the mapping of quantitative trait loci using full-sib families. *Genetics* 132: 1211-1222.
- KNOWLES PF, HILL AG (1964): Inheritance of fatty acid content in the seed oil of a safflower introduction from iran. *Crop. Sci.* 4: 406-409.
- KOJIMA T, NAGAOKA T, NODA K, OGIHARA Y (1998): Genetic linkage map of ISSR and RAPD markers in Einkorn wheat in relation to that of RFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* 96: 37-45.
- KONISHI T, MATSUURA S (1988): A new certation gene on the long arm of chromosome 3 in barley. *Barley Genet. Newsl.* 18: 33-37.
- KOSAMBI DD (1944): The estimation of map distances from recombination values. *Ann. Eugen.* 12: 172-175.
- KULPA W, DANERT S (1961): Zur Systematik von *Linum usitatissimum* L. *Die Kulturpflanze, Beih.* 3: 431-488.
- KURATA N, NAGAMURA K, YAMAMOTO K, HARUSHIMA Y, SUE N, WU J, ANTONIO BA, SHOMURA A, SHIMIZU T, LIN S-Y, INOUE T, FUKUDA A, SHIMANO T, KUBOKI Y, TOYAMA T, MIYAMOTO Y, KIRIHARA T, HAYASAJA K, MIYAO A, MONNA L, ZHONG HS, TAMURA Y, WANG Z-X, MOMMA T, UMEHARA Y, YANO M, SASAKI T, MINOBE Y (1994): A 300 kilobase interval genetic map of rice including 883 expressed sequences. *Nature Genet.* 8: 365-372.

**L**

- LAMBOY WF (1994): Computing genetic similarity coefficients from RAPD data – the effects of PCR artifacts. *PCR Meth. Appl.* 4: 31-37.
- LANDER ES, BOTSTEIN (1989): Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 124: 743-756.
- LANDER ES, GREEN P, ABRAHAMSON J, BARLOW A, DALY MJ, LINCOLN SE, NEWBURG L (1987): MAP-MAKER: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1: 174-181.
- LARTER EN, WENHARDT A, GORE R (1965): Redwood-65, an improved flax variety. *Can. J. Plant Sci.* 45: 515-516.
- LEVAN A (1942): The response of some flax strains to tetraploidy. *Hereditas* 28: 246-248.
- LINCOLN SE, LANDER ES (1992): Systematic detection of errors in genetic linkage data. *Genomics* 14: 604-610.
- LINDE-LAURSEN I, DOLL H, NIELSEN G (1982): Giemsa C-banding patterns and some biochemical markers in a pedigree of european barley. *Z. Pflanzenzüchtg.* 88: 191-219.
- LING HQ, BINDING H (1987): Plant regeneration from protoplasts in *Linum*. *Plant Breeding* 98: 312-317.
- LITT M, LUTY JA (1989): A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.* 4: 397-401.
- LU ZX, SOSINSKI B, REIGHARD GL, BAIRD WV, ABBOTT AG (1998): Construction of a genetic linkage map an identification of AFLP markers for resistance to root-knot nematodes in peach rootstocks. *Genome* 41:199-207.
- LUCKASZEWSKI P, CURTIS CA (1993): Physical distribution of recombination in B-genome chromosomes of tetraploid wheat. *Theor. Appl. Genet.* 85: 121-127.
- LYNCH M, WALSH B (1998): *Genetics and analysis of quantitative traits*. Sunderland, USA: Sinauer Associates, Inc.; 1998.

**M**

- MAHESWARAN M, SUBUDHI PK, NANDI S, XU JC, PARCO A, YANG DC, HUANG N (1997): Polymorphism, distribution, and segregation of AFLP markers in a double haploid rice population. *Theor. Appl. Genet.* 94: 39-45.
- MALIEPAARD C, ALSTON FH, VAN ARKEL G, BROWN LM, CHEVREAU E, DUNEMANN F, EVANS KM, GARDINER S, GUILFORD P, VAN HEUSDEN AW, JANSE J, LAURENS F, LYNN JR, MANGANARIS AG, DEN NIJS APM, PERIAM N, RIKKERING E, ROCHE P, RYDER C, SANSAVINI S, SCHMIDT H, TARTARINI S, VERGAEGH JJ, VRIELINK-VAN-GINKEL M, KING GJ (1998): Aligning male and female linkage maps of apple (*Malus pumila* Mill.) using multi-allelic markers. *Theor. Appl. Genet.* 97: 60-73.
- MARECK A, GAFFE J, MORVAN O, ALEXANDRE C, MORVAN C (1995): Characterization of isoforms of pectin methylesterase of *Linum usitatissimum* using polyclonal antibodies. *Plant and Cell Physiology* 36: 409-417.
- MARKERT CL, MÖLLER F (1959): Multiple forms of enzymes: tissue, autogene and species specific patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 45: 753-763.
- MARQUES CM, ARAUJO JA, FERREIRA JG, WHETTEN R, O'MALLEY DM, LIU BH, SEDEROFF R (1998): AFLP genetic maps of *Eucalyptus globulus* and *E. tereticornis*. *Theor. Appl. Genet.* 96: 727-737.
- MASIMA I (1947): The number of chromosomes and the nuclear chromosomes in *Linum usitatissimum* L. and some allied species. *Jap. J. Genet. Suppl.* 1: 122-131.
- MENDEL G (1866): Versuche über Pflanzenhybriden. *Verh. Naturf. Verl. Brünn* 4: 3-47.
- MENENDEZ CM, HALL AE, GEPTS P (1997): A genetic linkage map of cowpea (*Vigna unguiculata*) developed from a cross between two inbred, domesticated lines. *Theor. Appl. Genet.* 95: 1210-1217.
- MOHLER V (1998): Methodische Entwicklungen zur Genomanalyse bei Gerste und Weizen. *Dissertation an Technische Universität München. Freising: Eigenverlag; 1998.*
- MORRISON III WH, AKIN DE, HIMMELSBACH DS, GAMBLE GR (1999): Chemical, microscopic, and instrumental analysis of graded flax fibre and yarn. *J. Sci. Food. Agric.* 79: 3-10.
- MUCHA HJ (1992): Clusteranalyse mit Mikrocomputern. Berlin: Akademie Verlag GmbH; 1992.
- MULLIS KB, FALOONA FA (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase chain reaction. *Meth. Enzymol.* 155: 335-350.
- MUMM RH, DUDLEY JW (1994): A classification of 148 U.S. maize inbreds: I. Cluster analysis based on RFLPs. *Crop. Sci.* 34: 852-865.
- MUMM RH, HUBERT LJ, DUDLEY JW (1994): A classification of 148 U.S. maize inbreds: II. Validation of cluster analysis based on RFLPs. *Crop. Sci.* 34: 852-865.

**N**

- NAGAOKA T, OGIHARA Y (1997): Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 94: 597-602.
- NANDI S, SUBUDHI PK, SENADHIRA D, MANIGBAS NL, SEN-MANDI S, HUANG N (1997): Mapping QTLs for submergence tolerance in rice by AFLP analysis and selective genotyping. *Mol. Gen. Genet.* 255:1-8.
- NEI N, LI W (1979): Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 5269-5273.
- NI JJ, WU P, SENADHIRA D, HUANG N (1998): Mapping QTLs for phosphorus deficiency tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 97: 1361-1369.
- NICHTERLEIN K, MARQUARD R, FRIEDT W (1988): Breeding for modified fatty acid composition by induced mutations in linseed (*Linum usitatissimum* L.). *Plant Breed.* 101: 190-199.



- NICKEL M (1993): Untersuchungen zur Erweiterung der genetischen Variation des Fettsäuremusters beim Lein (*Linum usitatissimum* L.) mit Hilfe von Artkreuzungen und in vitro Techniken. Dissertation Universität Gießen. Aachen: Verlag Shaker; 1993.
- NIYOGI KK, FINK GR (1992): Two anthranilate synthase genes in *Arabidopsis*: defense-related regulation of the tryptophan path-way. *Plant Cell* 4: 721-733.
- NTIAMOAH C, ROWLAND GG, TAYLOR DC (1995): Inheritance of elevated palmitic acid in flax and its relationship to the low linolenic acid. *Crop Sci.* 35: 148-152.

**O**

- O'BRIEN J (1993): Genetic maps. Bd. 6: Plants. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 6. Aufl., 1993.
- OHLROGGE JB, JAWORSKI JG (1997): Regulation of fatty acid synthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 48: 109-136.
- OOIJEN VAN JW (1992): Accuracy of mapping quantitative trait loci in autogamous species. *Theor. Appl. Genet.* 84: 803-811.
- OSBORN TC, ALEXANDER DC, FORBES JF (1987): Identification of restriction fragment length polymorphisms linked to genes controlling soluble solids in tomato fruit. *Theor. Appl. Genet.* 73: 350-356.
- OTTAVIANO E, SARI-GORLA M, PE E (1982): Male gametophytic selection in maize. *Theor. Appl. Genet.* 63: 249-254.

**P**

- PAMMI S, SCHERTZ K, XU G, HART G, MULLET JE (1994): Random-amplified-polymorphic DNA markers in sorghum. *Theor. Appl. Genet.* 90: 542-548.
- PARAN I, GOLDMANN I, TANKSLEY SD, ZAMIR D (1995): Recombinant inbred lines for genetic mapping in tomato. *Theor. Appl. Genet.* 90: 542-548.
- PATERSON AH, DAMON S, HEWITT JD, PETERSON S, LINCOLN SE, TANKSLEY SD (1991): Mendelian factors underlying quantitative traits in tomato: Comparison across species, generations, and environments. *Genetics* 127: 181-197.
- PIRSON H (1955): Über die Meiosis bei *Linum usitatissimum* L. *Der Züchter* 25. 186-190.
- PLESSERS AG (1966): The variation in fatty acid composition of the seed of *Linum* species. *Can. J. Genet. Cytol.* 8: 328-335.
- PLONKA F (1951): Comportement génétique de quelques caractères de la fleur des grains chez le lin. *Ann. Inst. Nat. Rech. Agron.* 1, Ser.B: 155-178.
- PREVOST A, WILKINSON MJ (1999): A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 98: 107-112.

**Q**

- QI X, STAM P, LINDHOUT P (1996): Comparison and intergration of four barley genetic maps. *Genome* 39: 379-384.
- QI X, STAM P, LINDHOUT P (1998): Use of locus-specific AFLP markers to construct a high-density molecular map in barley. *Theor. Appl. Genet.* 96: 376-384.

**R**

- RATNAPARKHE MB, SANTRA DK, TULLU A, MUEHLBAUER FJ (1998 a): Inheritance of inter-simple-sequence-repeat polymorphisms and linkage with a fusarium wilt resistance gene in chickpea. *Theor. Appl. Genet.* 96:348-353.
- RATNAPARKHE MB, TEKEOGLU M, MUEHLBAUER FJ (1998 b): Inter-simple-sequence-repeat (IISR) polymorphisms are useful for finding markers associated disease resistance gene clusters. *Theor. Appl. Genet.* 97: 515-519.
- RAY C (1944): Cytological studies on the flax genus *Linum*. *Amer. J. Bot.* 31: 241-248.
- REITER RS, WILLIAMS JGK, FELDMANN KA, RAFALSKI A, TINGEY SV, SCOLNICK PA (1992): Global and local genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1477-1481.
- RICHTER K, SCHONDELMAIER J, JUNG C (1998): Mapping of quantitative trait loci affecting *Drechslera teres* resistance in barley with molecular markers. *Theor. Appl. Genet.* 97: 1225-1234.
- ROCHE DE LA IA, ALEXANDER DE, WEBER EJ (1971): Inheritance of oleic and linoleic acids in *Zea mays* L.. *Crop Sci.* 44: 499-504.
- RODSTAD SH, PATTON JC, SCHAAL BA (1988): M13- repeat unit probe detects DNA minisatellite sequences in gymnosperms and angiosperms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 9176-9178.
- ROGERS CM (1972): The taxonomic significance of the fatty acid content of seeds of *Linum*. *Brittonia* 24: 415-419.
- ROWLAND GG (1990): An EMS-induced low-linolenic-acid mutant in McGregor flax (*Linum usitatissimum* L.). *Can. J. Plant. Sci.* 71: 393-396.
- ROWLAND GG, BHATTY RS (1990): Ethyl methanesulphonate-induced fatty acid mutations in flax. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 67: 213-214.
- ROWLAND GG, MCHUGHEN A, GUSTA LV, BHATTY RS, MACKENZIE SL, TAYLOR DC (1995): The application of chemical mutagenesis and biotechnology to the modification of linseed (*Linum usitatissimum* L.). *Euphytica* 85: 317-321.
- RÜDIGER W (1942): Beiträge zur Kenntnis der Anatomie des Leinsamens mit besonderer Berücksichtigung der Samenfarbe. *Bastfaser* 2: 3-9.

**S**

- SAEDI G, ROWLAND GG (1997): The inheritance of variegated flax seed color and palmitic acid in flax. *The Journal of Heredity* 88: 466-468.
- SAGHAI MAROOF MA, SOLIMAN KM, JORGENSEN RA, ALLARD RW (1984): Ribosomal DNA Spacer length polymorphisms in barley: Species diversity, chromosomal locations and population dynamics. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 91: 5466-5470.
- SAGHAI MAROOF MA, ZHANG QF, BIYASHEV RM (1994): Molecular marker analyses of powdery mildew resistance in barley. *Theor. Appl. Genet.* 88: 733-740.
- SCHILLING E (1944): Lein, *Linum usitatissimum* L. In: *Handbuch der Pflanzenzüchtung* Bd. 4. Berlin: Verlag Paul Parey; 1. Aufl.1944.
- SCHLICHTERLE H (1989): Pfahlbauten: Die frühe Besiedlung des Alpenvorlandes. in: *Siedlungen der Steinzeit*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 1989.
- SCHOENFELD RM (1998): Identifizierung und molekulare Lokalisierung neuer Resistenzgenloci der Wildgerste (*Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*) gegen Mehltau (*Erysiphe graminis* fsp. *hordei*). Dissertation Technische Universität München. Aachen: Shaker Verlag, 1998.
- SCHONDELMAIER J, STEINRÜCKEN G, JUNG C (1996): Integration of AFLP markers into a linkage map of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Plant Breeding* 115: 231-237.

- SEWELL MM, SHERMAN BK, NEALE DB (1998): A consensus map for loblolly pine (*Pinus taeda* L.): I. Construction and integration of individual linkage maps from two outbred three-generation pedigrees. *Genetics* 151: 321-330.
- SHARON D, CREGAN PB, MHAMEED S, KUSHARSKA M, HILLEL J, LAHAV E, LAVI U (1997): An integrated genetic linkage map of avocado. *Theor. Appl. Genet.* 95: 911-921.
- SHAW FJF, KHAN AR, ALAM M (1931): Studies in indian oil-seeds: V. The inheritance of characters in Indian linseed. *Indian J. Agr. Sci.* 1: 1-57.
- SIEDLER H (1992): Versuche zur genetischen und physikalischen Kartierung des Gerstengenoms. Dissertation Technische Universität München. Aachen: Shaker Verlag, 1992.
- SMITH JSC, SMITH OS (1989): The description and assessment of distances between inbred lines of maize: I. The use of morphological traits as descriptors. *Maydica* 34: 141-150.
- SOMERS DJ, FRIESEN KRD, RAKOW G (1998): Identification of molecular markers associated with linoleic acid desaturation in *Brassica napus*. *Theor. Appl. Genet.* 96: 897-903.
- SOUTHERN EM (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.
- SPADA A, CAPORALI E, MARZIANI G, PORTALUPPI P, RESTIVO FM, TASSI F, FALAVIGNA A (1998): A genetic map of *Asparagus officinalis* based on integrated RFLP, RADP and AFLP molecular markers. *Theor. Appl. Genet.* 97: 1083-1089.
- SPIELMEYER W, GREEN AG, BITTISNICH D, MENDHAM N, LAGUDAH ES (1998 a): Identification of quantitative trait loci contributing to *Fusarium* wilt resistance on an AFLP linkage map of flax (*Linum usitatissimum*). *Theor. Appl. Genet.* 97: 633-641.
- SPIELMEYER W, LAGUDAH ES, MENDHAM N, GREEN AG (1998 b): Inheritance of resistance to flax wilt (*Fusarium oxysporum* f.sp. *lini* Schlecht) in a doubled haploid population of *Linum usitatissimum* L.. *Euphytica* 101: 287-291.
- STAM P (1993): Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: JoinMap. *Plant J.* 3: 739-744.
- STRASBURGER E, NOLL F, SCHENCK H, SCHIMPER AFW (1991): Lehrbuch der Botanik für Hochschulen. Stuttgart, Jena, New York: G. Fischer; 33. Aufl. 1991.
- STRYER L (1994): Biochemie. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 1994.
- STURTEVANT AH (1965): A history of genetics. New York: Harper & Row; 1965.
- STYMNE S, STOBART AK (1987): Oil synthesis in vitro in microsomal membranes from developing cotyledons of *Linum usitatissimum* L. *Planta* 164: 101-104.

## T

- TAHIR M, TURCHETTA T, ANWAR R, LAFIANDRA D (1996): Assessment of genetic variability in hexaploid wheat landraces of Pakistan based on polymorphism for HMW glutenin subunits. *Genet. Res. Crop. Evol.* 43: 211-220.
- TANHUANPAA PK, VILKKI JP, VILKKI HJ (1995): Association of a RAPD marker with linoleic acid concentration in the seed oil of rapeseed (*Brassica napus* L.). *Genome* 38: 414-416.
- TANKSLEY SD (1993): Mapping polygenes. *Ann. Rev. Genet.* 27: 205-233.
- TANKSLEY SD, RICK CM (1980): Isocymic gene linkage map of the tomato: applications in genetics and breeding. *Theor. Appl. Genet.* 57: 161-170.
- TANKSLEY SD, GANAL MW, PRINCE JP, DE VINCENTE MC, BONIERBALE MW, BROUN P, FULTON TM, GIOVANNONI JJ, GRANDILLO S, MARTIN GB, MESSEGUER R, MILLER JC, PATERSON AH, PINEDA O, RÖDER MS, WING RA, WU W, YOUNG ND (1992): High density molecular linkage maps of the tomato and potato genome. *Genetics* 132: 1141-1160.
- THAMMES T (1930): Die Genetik des Leins. *Der Züchter* 2: 245-257.

- THOMAS A, VON BRUCK CG (1985): Forderungen der Lebensmittelindustrie an neue Rapssorten. Fette, Seifen, Anstreichmittel 87:460-463.
- THORMANN CE, FERREIRA ME, CARMARGO LEA, TIVANG JG, OSBORN TC (1994): Comparison of genetic relationship estimates within and among cruciferous species based on RFLP and RAPD markers. Theor. Appl. Genet. 88: 973-980.
- THORMANN CE, ROMERO J, MANTET J, OSBORN TC (1996): Mapping loci controlling the concentrations of erucic and linolenic acids in seed oil of *Brassica napus* L. Theor. Appl. Genet. 93: 282-286.
- TINGEY NA, RAFALSKI JA WILLIAMS JGK (1992): Genetic analysis with RAPD markers. In: Applications of RAPD technology to plant breeding. Madison, USA: Crop Sci. Soc. Am., Am. Soc. Hort. Sci., Am. Genet. Assoc.; 1992.
- TRAVIS SE, RITLAND K, WHITHAM TG, KEIM P (1998): A genetic linkage map of Pinyon pine (*Pinus edulis*) based on amplified fragment length polymorphisms. Theor. Appl. Genet. 97: 871-880.
- TSUMURA Y, OHBA K, STRAUSS SH (1996): Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). Theor. Appl. Genet. 92: 40-45.

## U

- UTZ HF, MELCHINGER AE (1994): Comparison of different approaches to interval mapping of quantitative trait loci. In: Ooijen JF, Jansen J [Eds.]: Biometrics in plant breeding: application of molecular markers. Wageningen: CPRO-DLO; 1994.
- UTZ HF, MELCHINGER AE (1995): PLABQTL: A computer program to map QTL. Stuttgart: Eigenverlag; 1995.
- UTZ HF, MELCHINGER AE (1996): PLABQTL: A program for composite interval mapping of QTL. J. Quant. Trait Loci 2(1).

## V

- VAVILOV NI (1950): Selected writings of N.I. Vavilov. Chronica Bot. 13.
- VOORRIPS RE, JONGERIUS MCGREGOR-E1747, KANNE HJ (1997): Mapping of two genes for resistance to clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) in a Population of doubled haploid lines of *Brassica oleracea* by means of RFLP and AFLP markers. Theor. Appl. Genet. 94: 75-82.
- VOS P, HOGERS R, BLEEKER M, REIJANS M., VAN DE LEE T, HORNES M, FRIJTERS A, POT J, PELEMAN J, KUIPER M, ZABEAU M (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acid Res. 23: 4407-4414.

## W

- WANG GL, MACKILL DJ, BONMAN M, MCCOUCH SR, CHAMPOUX MCGREGOR-E1747, NELSON RJ (1994): RFLP mapping of genes conferring complete and partial resistance to blast in a durably resistant rice cultivar. Genetics 136: 1421-1434.
- WANG YH, THOMAS CE, DEAN RA (1997): A genetic map of melon (*Cucumis melo* L.) based on amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. Theor. Appl. Genet. 95: 791-798.
- WELSH J, MCCLELLAND M (1990): Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucl. Acids. Res. 18: 7213-7218.
- WEBER WE, BOCHARDT DC, KOCH G (1999): Combined linkage maps and QTLs in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) from different populations. Plant Breed. 118: 193-204.
- WILLIAMS JGK, HANAFEY MK, RAFALSKI JA, TINGEY SV (1993): Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. Meth. Enzymol. 218: 704-740.
- WINNACKER EL (1989): Gene and Klone. Weinheim: VCH, 1989.

**X**

- XIONG LZ, WANG SP, LIU KD, DAI XK, SAGHAI-MAROFF MA, HU JG, ZHANG QF (1998): Distribution of simple sequence repeat and AFLP markers in molecular linkage map of rice. *Acta Botanica Sinica* 40: 605-614.
- XU Y, ZHU L, XIAO J, HUANG N, MCCOUCH SR (1997): Chromosomal regions associated with segregation distortion of molecular markers in F<sub>2</sub>, backcross, doubled haploid, and recombinant inbred populations in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol. Gen. Genet.* 253: 535-545.

**Y**

- YAMAGISHI M, YANO M, FUKUTA Y, FUKUI M, OTANI M, SHIMADA T (1996): Distorted segregation of RFLP markers in regenerated plants derived from anther culture of an F<sub>1</sub> hybrid of rice. *Genes Genet. Syst.* 71: 37-41.
- YERMANDOS DM (1966): Variability in seed oil composition of 43 *Linum* species. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 43: 546-549.
- YERMANDOS DM, GILL KS (1967): Induction of polyploidy in *Linum* species. *Crop. Sci.* 2, 109-111.
- YERMANDOS DM, HELMSTREET SC (1965): Germplasm available for new varieties with different types of oil. *Calif. Agric.* 19:12-13.
- YERMANDOS DM, BEARD BH, GILL KS, ANDERSON MP (1966): Fatty acid composition of seed oil of wild species of *Linum*. *Agron. J.* 58: 30-32.
- YURENKOVA SI, KHOTYLEVA LV, TSEBRIKOV YV (1995): Tissue-specific expression of esterase isoenzymes in *Linum usitatissimum* L. *Biologia Plantarum* 37: 375-379.

**Z**

- ZAMIR D, TANKSLEY SD, JONES RA (1982): Haploid selection for low temperature tolerance of tomato pollen. *Genetics* 101: 129-137.
- ZENG ZB (1994): Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics* 136: 1457-1468.
- ZHU JH, STEPHENSON P, LAURIE DA, LI W, TANG D, GALE MD (1999): Towards rice genome scanning by map-based AFLP fingerprinting. *Mol. Gen. Genet.* 261: 184-195.
- ZEIST VAN W, BAKER-HEERES JAH (1975): Evidence for linseed cultivation before 6000 bc. *J. Archaeol. Sci.* 2: 215-219.
- ZEVEN AC, WET DE JMJ (1982): Dictionary of cultivated plants and their regions of diversity. Wageningen: Centre for Agricultural Publishing and Documentation; 1982.
- ZIETKIEWICZ E, RAFALSKI A, LABUDA D (1994): Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176-183.
- ZÖFEL P (1992): Univariate Varianzanalysen. Stuttgart, Jena: Gustav Fischer Verlag, 1992.

## 8 ANHANG

### 8.1 Standard-Lösungen

#### *Tris/HCl-Lösung (1 M; pH 8,0)*

Die entsprechende Menge Tris wurde in 80% des Endvolumens  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  gelöst, mit  $\text{HCl}_{\text{conc.}}$  auf den pH-Wert 8,0 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  bis zu dem gewünschten Endvolumen aufgefüllt. Die Lösung wurde autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

#### *Tris/Acetat-Lösung (1 M; pH 8,0)*

Die entsprechende Menge Tris wurde in 80% des Endvolumens  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  gelöst, mit conc.. Essigsäure (*Eisessig*) auf den pH-Wert 8,0 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  bis zu dem gewünschten Endvolumen aufgefüllt. Die Lösung wurde autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

#### *EDTA (0,5 M; pH 8,0)*

Die entsprechende Menge EDTA-Na-Salz wurde in 80% des Endvolumens  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  gelöst, mit NaOH auf den pH-Wert von 8,0 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  bis zu dem gewünschten Endvolumen aufgefüllt. Die Lösung wurde autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

#### *NaAc (3M)*

Die entsprechende Menge Natriumacetat wurde abgewogen und mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  auf das gewünschte Endvolumen aufgefüllt. Die Lösung wurde autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

#### *CTAB-Puffer (2x)*

2,0% (w/v)	CTAB
200 mM	Tris/HCl (1 M; pH 8,0)
20 mM	EDTA (0,5 M; pH 8,0)
1,4 M	NaCl
1,0% (w/v)	PVC
280 mM	BME ( <i>kurz vor der Verwendung hinzufügen</i> )

#### *TE-Puffer (1x)*

10 mM	Tris/HCL (1 M; pH 8,0)
1 mM	EDTA (1 M; pH 8,0)

Die Lösung wurde autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

#### *TAE-Puffer (1x; pH 8,0)*

40 mM	Tris/Acetat (pH 8,0)
1 mM	EDTA

Die Lösung wurde autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

*Beladungspuffer (10x) für Agarosegele*

40% (v/v) Glycerin

200 mM EDTA

0,03% (w/v) Bromphenolblau

## 8.2 Pflanzenmaterial

### 8.2.1 Population I

Linie	Kreuzung
1737	Atalante x Szegedi62
1739	Atalante x Szegedi62
1740	Atalante x Szegedi62
1741	Atalante x Szegedi62
1742	Atalante x Szegedi62
1743	Atalante x Szegedi62
1744	Atalante x Szegedi62
1746	Atalante x Szegedi62
1749	Atalante x Szegedi62
1751	Atalante x Szegedi62
1752	Atalante x Szegedi62
1761	Atalante x Szegedi62
1762	Atalante x Szegedi62
1763	Atalante x Szegedi62
1767	Atalante x Szegedi62
1768	Atalante x Szegedi62
1773	Atalante x Szegedi62
1775	Atalante x Szegedi62
1776	Atalante x Szegedi62
1777	Atalante x Szegedi62
1779	Atalante x Szegedi62
1780	Atalante x Szegedi62
1781	Atalante x Szegedi62
1786	Atalante x Szegedi62
1787	Atalante x Szegedi62
1790	Atalante x Szegedi62
1791	Atalante x Szegedi62
1793	Atalante x Szegedi62
1794	Atalante x Szegedi62
1797	Atalante x Szegedi62
1798	Atalante x Szegedi62
1803	Atalante x Szegedi62
1804	Atalante x Szegedi62
1805	Atalante x Szegedi62
1806	Atalante x Szegedi62
1809	Atalante x Szegedi62
1810	Atalante x Szegedi62
1811	Atalante x Szegedi62
1813	Atalante x Szegedi62
1815	Atalante x Szegedi62
1817	Atalante x Szegedi62
1818	Atalante x Szegedi62
1823	Atalante x Szegedi62
1824	Atalante x Szegedi62
1825	Atalante x Szegedi62
1826	Atalante x Szegedi62
1827	Atalante x Szegedi62
1828	Atalante x Szegedi62
1829	Atalante x Szegedi62
1830	Atalante x Szegedi62
1833	Atalante x Szegedi62
1835	Atalante x Szegedi62
1836	Atalante x Szegedi62
1837	Atalante x Szegedi62
1838	Atalante x Szegedi62
1839	Atalante x Szegedi62
1840	Atalante x Szegedi62
1841	Atalante x Szegedi62

Linie	Kreuzung
1848	Szegedi62 x Atalante
1851	Szegedi62 x Atalante
1852	Szegedi62 x Atalante
1854	Szegedi62 x Atalante
1858	Szegedi62 x Atalante
1860	Szegedi62 x Atalante
1862	Szegedi62 x Atalante
1864	Szegedi62 x Atalante
1865	Szegedi62 x Atalante
1870	Szegedi62 x Atalante
1871	Szegedi62 x Atalante
1872	Szegedi62 x Atalante
1874	Szegedi62 x Atalante
1876	Szegedi62 x Atalante
1877	Szegedi62 x Atalante
1881	Szegedi62 x Atalante
1883	Szegedi62 x Atalante
1885	Szegedi62 x Atalante
1886	Szegedi62 x Atalante
1888	Szegedi62 x Atalante
1889	Szegedi62 x Atalante
1890	Szegedi62 x Atalante
1893	Szegedi62 x Atalante
1896	Szegedi62 x Atalante
1898	Szegedi62 x Atalante
1899	Szegedi62 x Atalante
1900	Szegedi62 x Atalante
1901	Szegedi62 x Atalante
1902	Szegedi62 x Atalante
1905	Szegedi62 x Atalante
1908	Szegedi62 x Atalante
1909	Szegedi62 x Atalante
1910	Szegedi62 x Atalante
1912	Szegedi62 x Atalante
1914	Szegedi62 x Atalante
1917	Szegedi62 x Atalante
1918	Szegedi62 x Atalante
1923	Szegedi62 x Atalante
1924	Szegedi62 x Atalante
1929	Szegedi62 x Atalante
1930	Szegedi62 x Atalante
1932	Szegedi62 x Atalante
1934	Szegedi62 x Atalante
1935	Szegedi62 x Atalante
1936	Szegedi62 x Atalante
1937	Szegedi62 x Atalante
1938	Szegedi62 x Atalante
1941	Szegedi62 x Atalante
1942	Szegedi62 x Atalante
1943	Szegedi62 x Atalante
1946	Szegedi62 x Atalante
1947	Szegedi62 x Atalante
1948	Szegedi62 x Atalante
1949	Szegedi62 x Atalante
1950	Szegedi62 x Atalante



## 8.2.2 Population II

Linie	Kreuzung
L2-001	Viking x McGregor-E1747
L2-002	Viking x McGregor-E1747
L2-004	Viking x McGregor-E1747
L2-005	Viking x McGregor-E1747
L2-006	Viking x McGregor-E1747
L2-008	Viking x McGregor-E1747
L2-012	Viking x McGregor-E1747
L2-013	Viking x McGregor-E1747
L2-016	Viking x McGregor-E1747
L2-017	Viking x McGregor-E1747
L2-024	Viking x McGregor-E1747
L2-026	Viking x McGregor-E1747
L2-028	Viking x McGregor-E1747
L2-033	Viking x McGregor-E1747
L2-034	Viking x McGregor-E1747
L2-038	Viking x McGregor-E1747
L2-039	Viking x McGregor-E1747
L2-044	Viking x McGregor-E1747
L2-046	Viking x McGregor-E1747
L2-048	Viking x McGregor-E1747
L2-050	Viking x McGregor-E1747
L2-052	Viking x McGregor-E1747
L2-054	Viking x McGregor-E1747
L2-055	Viking x McGregor-E1747
L2-057	Viking x McGregor-E1747
L2-058	Viking x McGregor-E1747
L2-061	Viking x McGregor-E1747
L2-062	Viking x McGregor-E1747
L2-063	Viking x McGregor-E1747
L2-064	Viking x McGregor-E1747
L2-066	Viking x McGregor-E1747
L2-070	Viking x McGregor-E1747
L2-075	Viking x McGregor-E1747
L2-077	Viking x McGregor-E1747
L2-078	Viking x McGregor-E1747
L2-080	Viking x McGregor-E1747
L2-081	Viking x McGregor-E1747
L2-082	Viking x McGregor-E1747
L2-084	Viking x McGregor-E1747
L2-085	Viking x McGregor-E1747
L2-086	Viking x McGregor-E1747
L2-088	Viking x McGregor-E1747
L2-091	Viking x McGregor-E1747
L2-094	Viking x McGregor-E1747
L2-095	Viking x McGregor-E1747

Linie	Kreuzung
L2-096	Viking x McGregor-E1747
L2-097	Viking x McGregor-E1747
L2-098	Viking x McGregor-E1747
L2-102	Viking x McGregor-E1747
L2-103	Viking x McGregor-E1747
L2-105	Viking x McGregor-E1747
L2-106	Viking x McGregor-E1747
L2-109	Viking x McGregor-E1747
L2-114	Viking x McGregor-E1747
L2-116	Viking x McGregor-E1747
L2-119	Viking x McGregor-E1747
L2-120	Viking x McGregor-E1747
L2-122	Viking x McGregor-E1747
L2-125	Viking x McGregor-E1747
L2-126	Viking x McGregor-E1747
L2-127	Viking x McGregor-E1747
L2-128	Viking x McGregor-E1747
L2-132	Viking x McGregor-E1747
L2-133	Viking x McGregor-E1747
L2-134	Viking x McGregor-E1747
L2-135	Viking x McGregor-E1747
L2-137	Viking x McGregor-E1747
L2-139	Viking x McGregor-E1747
L2-141	Viking x McGregor-E1747
L2-142	Viking x McGregor-E1747
L2-143	Viking x McGregor-E1747
L2-147	Viking x McGregor-E1747
L2-149	Viking x McGregor-E1747
L2-151	Viking x McGregor-E1747
L2-152	Viking x McGregor-E1747
L2-153	Viking x McGregor-E1747
L2-154	Viking x McGregor-E1747
L2-156	Viking x McGregor-E1747
L2-158	Viking x McGregor-E1747
L2-159	Viking x McGregor-E1747
L2-160	Viking x McGregor-E1747
L2-161	Viking x McGregor-E1747
L2-162	Viking x McGregor-E1747
L2-164	Viking x McGregor-E1747
L2-165	Viking x McGregor-E1747
L2-166	Viking x McGregor-E1747
L2-172	Viking x McGregor-E1747
L2-173	Viking x McGregor-E1747
L2-176	Viking x McGregor-E1747

## 8.3 RAPD-Primer

### 8.3.1 Übersicht über alle getesteten RAPD-Primer

Nr.	Roth	Sequenz	GC-Gehalt	Nr.	Roth	Sequenz	GC-Gehalt
1	180.01	GCA CCC GAC G	80%	41	280.01	GCA GCA GCC G	80%
2	180.02	CGC CCA AGC C	80%	42	280.02	CGA CGC GTG C	80%
3	180.03	CCA TGG CGC C	80%	43	280.03	ACC CGT CCC C	80%
4	180.04	CGC CCG ATC C	80%	44	280.04	GCA GCT CCG G	80%
5	180.05	ACC CCA GCC G	80%	45	280.05	CGA GAC GGG C	80%
6	180.06	GCA CGG AGG G	80%	46	280.06	ACC GCC TCC C	80%
7	180.07	GCA CGC CGG A	80%	47	280.07	GCA GGT CGC G	80%
8	180.08	CGC CCT CAG C	80%	48	280.08	GGC CAC AGC G	80%
9	180.09	GCA CGG TGG G	80%	49	280.09	ACG CCC TGG C	80%
10	180.10	CGC CCT GGT C	80%	50	280.10	CGC GAA CGG C	80%
11	170.01	CAT CCC GAA C	70%	51	380.01	ACG CGC CAG G	80%
12	170.02	CAG GGT CGA C	70%	52	380.02	ACT CGG CCC C	80%
13	170.03	ACG GTG CCT G	70%	53	380.03	GGC CCC ATC G	80%
14	170.04	CGC ATT CCG C	70%	54	380.04	CGC GAG GTG C	80%
15	170.05	GAG ATC CGC G	70%	55	380.05	CGA TCC GCG C	80%
16	170.06	GGA CTC CAC G	70%	56	380.06	CCC GAC TGC C	80%
17	170.07	ATC TCC CGG G	70%	57	380.07	GGC AAG CGG G	80%
18	170.08	CTG TAC CCC C	70%	58	380.08	CGC ACC GCA C	80%
19	170.09	TGC AGC ACC G	70%	59	380.09	ACG GCG GCT C	80%
20	170.10	CAG ACA CGG C	70%	60	380.10	CGC GCT ACG C	80%
21	160.01	CGC AGT ACT C	60%	61	370.01	TCC CTG TGC C	70%
22	160.02	GTC CTA CTC G	60%	62	370.02	GCT CTC CGT G	70%
23	160.03	CTA CAC AGG C	60%	63	370.03	GAG ACG TCC C	70%
24	160.04	GTC CTT AGC G	60%	64	370.04	GTA TGC CGC G	70%
25	160.05	GTC CTC AAC G	60%	65	370.05	GCA CCG AAC G	70%
26	160.06	CTA CTA CCG C	60%	66	370.06	CCG GCG TAT C	70%
27	160.07	GAG TCA CTC G	60%	67	370.07	AGC CTG ACG C	70%
28	160.08	GTC CTC AGT G	60%	68	370.08	GCT CTG GCA G	70%
29	160.09	CGT CGT TAC C	60%	69	370.09	CGC ACT CGT C	70%
30	160.10	GCA GAC TGA G	60%	70	370.10	CTG TCC GGT C	70%
31	270.01	GTC TCG TCG G	70%	71	470.01	GCC CCT CTT G	70%
32	270.02	GGC CTA CTC G	70%	72	470.02	GGA CCG ACT G	70%
33	270.03	GTG TAG GGC G	70%	73	470.03	CTG TCG GCT C	70%
34	270.04	CGG GTC GAT C	70%	74	470.04	GGA CCG CTA G	70%
35	270.05	GCC CTC TTC G	70%	75	470.05	CAT GTC CGC C	70%
36	270.06	CAG GGG CAT C	70%	76	470.06	GCA CGT GAG G	70%
37	270.07	GAG ACC TCC G	70%	77	470.07	CTA TCG CCG C	70%
38	270.08	GGC CTT CAG G	70%	78	470.08	GAG AGG GAG G	70%
39	270.09	GCT CTC ACC G	70%	79	470.09	CCG GGG TTA C	70%
40	270.10	TGC ACG GAC G	70%	80	470.10	CGC AGA CCT C	70%

Nr.	Roth	Sequenz	GC-Gehalt
81	480.01	CAC CCT GCG C	80%
82	480.02	GCC CCA TGC G	80%
83	480.03	CGC AGT GGG C	80%
84	480.04	CGC CAC GAG C	80%
85	480.05	CAC CTG CCG C	80%
86	480.06	GGC CTC CAC G	80%
87	480.07	CGC CAG GAG C	80%
88	480.08	CGC GTC AGC C	80%
89	480.09	CTC CGC AGG C	80%
90	480.10	TGG TCG GCG C	80%
91	260.01	GAG TCT GTC G	60%
92	260.02	CGA ACT CGT C	60%
93	260.03	GGA ACC CAT G	60%
94	260.04	CGC TAT CTG C	60%
95	260.05	GCA GTA TGC G	60%
96	260.06	GGC GAT ATG G	60%
97	260.07	CCC TTA CTG G	60%
98	260.08	GTC GAC AAC G	60%
99	260.09	CCT GAT GAC C	60%
100	260.10	GAC CGA CAC G	60%
101	360.01	GAG TGT CTC G	60%
102	360.02	CAC ATA GCG C	60%
103	360.03	CGA AGC GAT C	60%
104	360.04	CCC TCA TCC [sic!]	60%
105	360.05	CCT GTT AGC C	60%
106	360.06	GCA GCT CAT G	60%
107	360.07	CGC TTG CTA G	60%
108	360.08	GAA CCT ACG G	60%
109	360.09	CTA GCT GAG C	60%
110	360.10	GAG CAG GCT G	60%
111	460.01	TGC GCG ATC G	60%
112	460.02	GCA GGA TAC G	60%
113	460.03	CTG CGA TAC C	60%
114	460.04	GCA GAG AAG G	60%
115	460.05	CTA GCT CTG G	60%
116	460.06	GTA GCC ATG G	60%
117	460.07	AAC GTA CGC G	60%
118	460.08	CGA TGA GCC C	60%
119	460.09	CGC TGT TAC C	60%
120	460.10	CTA GGT CTG C	60%

### 8.3.2 Zur Kartierung der Population I [Szegedi62 x Atalante] verwendete RAPD-Primer

RAPD-Primer	GC-Gehalt	Amplifizierte Fragmente	Polymorphe Fragmente
R160-09	60%	8	1
R260-02	60%	5	1
R460-03	60%	6	1
R460-04	60%	4	1
R170-07	70%	5	1
R170-10	70%	5	1
R270-10	70%	6	1
R370-04	70%	6	2
R370-06	70%	8	1
R370-09	70%	9	2
R180-02	80%	7	2
R180-05	80%	3	1
R180-06	80%	8	1
R180-06	80%	5	2
R280-04	80%	4	1
R280-09	80%	5	1
R380-03	80%	8	1
R380-05	80%	7	2
R480-07	80%	7	1
Summe		116	24
Mittelwert		6,1	1,3

## 8.4 ISSR-Primer

Name	Basensequenz	Amplifikation
(AC) <sub>7</sub> AGG	ACA CAC ACA CAC ACA GG	4 Fragmente
AGC GR*	AGC AGC AGC AGC GR	8 Fragmente
CAA-6	CAA CAA CAA CAA CAA CAA	keine deutlichen Fragmente
CAR*	CAC ACA CAC ACA R	5 Fragmente
GAA-7	GAA GAA GAA GAA GAA GAA GAA	keine deutlichen Fragmente
GAA-9	GAA GAA GAA GAA GAA GAA GAA GAA GA	2-3 diffuse Fragmente
GCTY*	GCT GCT GCT GCT Y	4 diffuse Fragmente
UBC-801	ATA TAT ATA TAT ATA TT	nicht amplifiziert
UBC-804	TAT ATA TAT ATA TAT AA	nicht amplifiziert
UBC-807	AGA GAG AGA GAG AGA GT	2 Fragmente
UBC-810	GAG AGA GAG AGA GAG AT	3 Fragmente
UBC-813	CTC TCT CTC TCT CTC TT	3 Fragmente
UBC-816	CAC ACA CAC ACA CAC AT	keine deutlichen Fragmente
UBC-819	GTG TGT GTG TGT GTG TA	keine deutlichen Fragmente
UBC-822	TCT CTC TCT CTC TCT CA	keine deutlichen Fragmente
UBC-825	ACA CAC ACA CAC ACA CT	7 Fragmente, 1 Polymorphismus
UBC-826	ACA CAC ACA CAC ACA CC	9 Fragmente, 3 Polymorphimen
UBC-827	ACA CAC ACA CAC ACA CG	6 Fragmente
UBC-828	TGT GTG TGT GTG TGT GA	keine deutlichen Fragmente
UBC-855	ACA CAC ACA CAC ACA C(CT)T	7 Fragmente
UBC-860	TGT GTG TGT GTG TGT G(AG)A	6 Fragmente
UBC-864	ATG ATG ATG ATG ATG ATG	5-6 diffuse Fragmente
UBC-866	CTC CTC CTC CTC CTC CTC	5 diffuse Fragmente

\*= aus KANTEY et al. 1995

## 8.5 AFLP-Primer

<b>EcoRI/MseI-Primer</b>	<b>Farbstoff</b>	<b>Polymorphe Fragmente</b>	<b>Fragmente (gesamt)</b>
ACA/CAT	5FAM	5	148
ACT/CGA	5FAM	5	116
ACT/CTT	5FAM	5	125
AGT/CAA	5FAM	10	105
AGT/CAT	5FAM	6	98
AGT/CGA	5FAM	6	99
AGT/CTC	5FAM	6	103
AGT/CTG	5FAM	8	108
AGT/CTT	5FAM	5	105
AAG/CAC	JOE	7	>250
ACG/CAA	JOE	1	190
ACG/CTC	JOE	3	54
ACG/CTG	JOE	4	109
AGG/CAC	JOE	6	81
AGG/CTA	JOE	5	>250
AGG/CTT	JOE	4	?
AAC/CAT	TAMRA	5	54
AAC/CTC	TAMRA	6	61
ACC/CAC	TAMRA	3	58
ACC/CTA	TAMRA	6	56
ACC/CTG	TAMRA	1	112
AGC/CAA	TAMRA	4	61
AGC/CAT	TAMRA	3	143
AGC/CGA	TAMRA	4	112
AGC/CTG	TAMRA	6	38

## 8.6 Steuerungsparameter des ABI 377 Prism DNA Sequencers

Parameter	Plate Check A	Pre-Run	Run
Electrophoresis Voltage	0 V	2500 V	2500 V
Electrophoresis Current	0 mA	50 mA	50 mA
Electrophoresis Power	0 W	150 W	150 W
CCD Offset	250	250	250
Collection Time	1 h	1 h	4 h
Gel Temperature	20° C	51° C	51° C
Laser Power	40 mW	40 mW	41 mW
CCD Gain	2	2	2

## 8.7 Steuerungsparameter des Gaschromatographen

### 8.7.1 Analyse 1

**Heated Zones:**

Injektor A: CAP  
Injektor A Setpoint: 230° C  
Detector A: 230° C  
Auxiliary (NONE): 0° C

Injektor B: NONE  
Injektor B Setpoint: OFF  
Detector B: 0°

**Oven Program:**

Cryogenics: OFF  
Initial Temp: 200° C  
Initial Hold: 6.0 min  
Equilibration Time: 0.0 min  
Total Run Time: 6.0 min

Maximum Temp: 240° C

**Channel Parameters:**

Data will be collected from channel A.  
Channel A signal source: DetA  
Analog Output: INT  
Attenuation: -4  
Offset: 5.0 mV  
Delay Time: 0.0 min  
Run Time: 6.0 min  
Sampling rate: 6.2500 pts/s

Channel B signal source: DetB  
Analog Output: INT  
Attenuation: 0  
Offset: 5.0 mV

**Autosampler Method:**

Injection Volume: 1.0 µl  
Injection Speed: NORM  
Viscosity Delay: 0  
Waste Vial: 2

Pre-Sequence Washes: 1  
Sample Washes: 3  
Sample Pumps: 3  
Solvent A Washes: 3

**Carriers Parameters:**

Carrier A Setpoint: 100.0 kPa

**Valve Configuration and Settings:**

Valve 1: Split on  
Valve 2-6: NONE

**Detector Parameters:**

Detector A: FID  
Range: 1  
Time Constant: 200  
Autozero: ON

Detector B: NONE



**8.7.2 Analyse 2**

Column:	25m x 0,25mm I.D. FFAP (Machery & Nagel)
Film thickness:	0,25 µm
Start temperature:	180° C
Heating rate:	2°C/min
End temperature:	210°C
Split injection:	1:70
Carrier gas:	150 kPa H <sub>2</sub>
Injection temperature:	230° C
Detection temperature:	230° C

## 8.8 Ergebnisse der Fettsäureanalyse

### 8.8.1 Population I [Szegedi62 x Atalante]

F6-RI-Linie	C16:0 [%]	C18:0 [%]	C18:1 [%]	C18:2 [%]	C18:3 [%]
Szegedi62	5,84	4,52	31,36	16,16	42,12
Atalante	6,52	3,84	33,19	17,14	39,32
1737	6,63	4,73	21,63	-	-
1738	6,85	4,06	23,22	18,49	47,38
1739	6,50	4,07	28,90	15,05	45,48
1740	6,46	4,98	26,58	15,42	46,56
1741	6,51	3,87	25,88	17,70	46,07
1742	6,72	4,05	22,99	16,26	49,98
1743	6,64	3,66	25,00	16,34	48,37
1744	7,15	5,10	21,39	12,77	53,60
1746	5,97	3,48	21,17	15,91	53,47
1749	6,62	3,21	19,25	16,20	54,72
1751	6,22	3,24	16,12	15,51	58,91
1752	6,45	3,42	17,77	15,71	56,65
1753	6,67	4,02	17,52	15,49	56,30
1763	6,92	4,12	18,50	15,89	54,57
1765	6,94	4,34	23,05	16,20	49,47
1766	7,31	4,75	27,72	17,22	43,00
1767	7,15	3,86	20,18	15,37	53,47
1768	7,01	4,17	21,47	13,09	54,27
1769	7,76	4,76	22,78	13,43	51,27
1770	7,60	3,81	23,67	15,22	49,70
1773	6,09	3,58	22,46	11,07	56,80
1774	6,86	3,29	21,86	14,38	53,61
1775	6,28	3,46	19,10	15,26	55,88
1776	7,36	4,94	26,02	14,86	46,83
1779	7,21	4,08	24,51	13,37	50,83
1780	6,22	3,66	19,26	11,83	59,02
1781	6,99	3,46	20,64	13,41	55,49
1785	6,65	4,32	29,14	14,38	45,51
1786	7,15	4,17	31,61	14,08	42,99
1787	6,10	3,23	19,07	13,12	58,49
1789	6,63	3,51	18,74	14,38	56,74
1791	6,82	3,73	20,42	15,41	53,63
1792	6,15	4,11	21,30	15,38	53,05
1793	7,07	4,96	25,05	14,08	48,84
1794	7,23	4,00	21,42	14,98	52,38
1802	7,10	3,63	21,92	15,15	52,20
1803	6,28	3,63	22,22	12,46	55,41
1804	6,41	3,88	18,68	13,82	57,22
1806	6,51	3,68	23,87	14,42	51,72
1810	7,92	4,73	23,07	15,55	48,73
1812	7,34	3,87	24,22	14,60	49,97
1813	6,57	3,66	28,76	15,72	45,28
1814	7,68	3,36	20,09	16,81	52,06
1815	7,13	4,43	25,36	16,04	47,04
1816	6,63	3,12	19,44	15,17	55,73

F6-RI-Linie	C16:0 [%]	C18:0 [%]	C18:1 [%]	C18:2 [%]	C18:3 [%]
1817	7,54	3,96	24,45	13,43	50,63
1818	7,64	4,30	21,91	13,63	52,53
1821	7,00	4,33	25,53	16,05	47,10
1822	7,31	5,16	24,23	13,83	49,47
1823	7,01	4,82	24,04	16,57	47,56
1824	7,16	3,77	18,66	14,82	55,61
1825	7,51	3,52	20,06	15,84	53,07
1826	6,33	3,51	22,00	15,89	52,27
1827	6,78	5,01	27,85	15,37	44,99
1828	-	3,94	21,71	15,75	49,48
1833	6,75	3,94	21,12	16,21	51,98
1834	6,34	3,50	19,56	15,45	55,15
1836	6,56	3,14	17,63	13,93	58,77
1837	6,84	3,88	24,00	14,62	50,67
1838	6,66	3,46	17,91	12,73	59,22
1839	6,61	3,77	19,74	15,72	54,17
1840	6,70	3,27	17,75	15,39	56,89
1849	7,51	3,78	22,89	16,28	49,54
1850	6,67	3,08	23,85	-	-
1851	6,70	3,85	21,11	18,09	50,24
1852	6,85	3,56	20,02	16,97	52,60
1853	6,46	4,01	24,75	14,44	50,33
1854	6,40	3,51	21,09	16,46	52,54
1857	7,32	3,68	22,90	16,90	49,20
1858	6,74	3,56	26,56	15,64	47,51
1859	6,90	3,07	18,02	15,59	56,41
1860	7,04	4,37	24,61	17,01	46,98
1861	6,89	3,92	23,07	18,18	47,94
1863	6,98	3,48	24,89	17,40	47,25
1865	6,16	2,75	16,99	15,97	58,14
1866	6,36	3,50	20,33	15,22	54,59
1869	6,01	3,39	20,42	16,32	53,86
1870	6,85	3,29	18,72	15,44	55,69
1872	7,20	3,75	29,07	17,28	42,71
1873	6,83	3,55	27,80	16,97	44,85
1874	7,22	3,79	23,72	18,54	46,72
1875	6,44	3,17	20,46	14,78	55,15
1876	6,61	4,00	26,73	13,37	49,28
1877	6,56	3,72	21,33	14,18	54,20
1878	6,69	3,78	24,95	18,36	46,22
1881	6,99	3,53	19,61	16,92	52,94
1882	8,13	5,21	30,49	19,6	-
1883	7,06	3,98	25,20	17,22	46,54
1886	6,61	3,07	25,18	15,99	49,14
1888	6,77	3,54	22,46	15,85	51,39
1890	5,62	3,04	21,66	12,59	57,09
1895	6,48	4,15	22,15	16,72	50,51

<b>F6-RI-Linie</b>	<b>C16:0 [%]</b>	<b>C18:0 [%]</b>	<b>C18:1 [%]</b>	<b>C18:2 [%]</b>	<b>C18:3 [%]</b>
1897	6,47	3,27	21,00	17,60	51,67
1899	6,67	3,34	17,41	13,78	58,80
1900	6,60	3,44	18,32	15,79	55,85
1901	7,36	3,67	27,05	15,88	46,07
1902	6,54	2,93	22,70	18,44	49,39
1905	6,52	3,11	19,79	16,01	54,57
1907	6,44	4,06	19,21	15,89	54,41
1908	7,08	3,08	22,55	16,73	50,56
1909	7,42	3,43	20,58	15,90	52,66
1910	6,20	3,93	18,45	16,12	56,30
1912	6,29	3,44	21,61	16,44	52,21
1913	6,62	3,77	18,52	15,10	55,99
1914	6,58	3,75	22,31	16,08	51,28
1917	6,46	3,62	20,99	16,63	52,29
1918	6,97	4,27	24,00	18,06	46,71
1920	7,28	4,72	30,85	13,25	43,89
1922	6,59	3,64	18,77	15,33	55,67
1923	6,78	4,08	24,93	15,38	48,83
1925	6,57	3,74	22,47	16,55	50,76
1929	5,98	3,24	23,54	17,73	49,51
1930	6,74	4,21	20,56	16,32	52,17
1931	6,77	3,62	19,16	15,78	54,77
1932	6,69	3,80	17,94	15,76	55,80
1933	7,10	3,83	24,50	15,27	49,30
1937	6,37	3,53	28,82	15,95	45,53
1938	7,14	5,29	28,37	17,88	41,32
1942	8,4	5,26	29,13	-	56,55
1943	6,32	3,08	19,55	15,50	55,55
1944	6,41	2,93	16,16	12,78	61,71
1947	6,73	3,44	28,93	15,01	45,89
1948	7,32	4,51	29,76	12,65	45,74

### 8.8.2 Population II [Viking x McGregor-E1747]

F5-RI-Linie	C16:0 [%]	C18:0 [%]	C18:1 [%]	C18:2 [%]	C18:3 [%]	And. [%]
VM-001	5,1	3,6	19,1	48,7	22,8	0,6
VM-002	5,2	3,5	17,4	27,5	45,8	1,3
VM-004	6,6	3,5	22,5	61,3	5,5	0,4
VM-005	5,8	2,7	18,3	69,8	2,1	0,6
VM-006	5,9	2,3	17,6	20,5	52,9	0,7
VM-008	5,2	3,7	23,4	24,7	42,1	0,6
VM-012	5,8	5,2	22,3	30,4	35,5	0,8
VM-013	5,8	3,2	19,4	18,9	51,9	1,1
VM-016	6,1	3,3	21,2	18,0	50,5	0,7
VM-017	5,9	2,8	16,9	17,6	55,9	0,7
VM-024	5,6	2,9	20,9	17,3	52,2	0,9
VM-026	6,4	3,1	21,1	59,5	9,2	0,4
VM-028	7,0	2,5	16,8	70,2	2,5	0,5
VM-033	6,3	2,7	20,3	31,6	38,5	0,5
VM-034	6,8	3,1	17,9	58,7	12,7	0,7
VM-038	6,3	2,9	17,3	36,3	36,6	0,6
VM-039	5,7	2,9	20,2	38,4	32,1	0,7
VM-044	6,9	4,0	19,9	22,9	45,2	0,5
VM-046	6,2	3,1	17,7	29,3	42,9	0,6
VM-048	6,2	3,3	22,7	36,3	30,8	0,6
VM-050	6,5	2,5	19,1	19,4	51,4	0,6
VM-052	6,7	4,5	18,0	37,9	32,2	0,6
VM-054	6,0	3,9	15,1	34,1	40,3	0,9
VM-055	5,7	2,7	19,4	46,8	24,8	1,1
VM-057	5,8	2,3	16,9	39,4	35,1	1,1
VM-058	6,2	3,5	22,2	29,8	37,8	0,6
VM-061	6,5	3,7	16,5	39,2	33,5	0,5
VM-062	5,7	3,3	16,4	39,7	34,2	1,0
VM-063	6,0	3,8	27,0	34,0	28,5	1,1
VM-064	6,3	2,9	18,4	68,5	3,1	0,6
VM-066	5,7	2,6	16,7	29,7	44,7	0,8
VM-070	6,2	4,4	19,5	19,6	49,2	0,9
VM-075	5,6	3,1	17,1	70,1	3,2	0,9
VM-077	6,1	4,6	22,8	35,4	30,5	0,7
VM-078	5,6	3,2	18,9	18,9	52,7	0,9
VM-080	5,8	3,1	21,7	36,3	32,6	0,7
VM-081	6,3	2,5	17,6	70,0	3,1	0,6
VM-082	6,3	2,5	17,8	33,3	39,4	0,6
VM-084	6,4	4,1	16,1	39,5	33,3	0,5
VM-085	6,3	3,5	15,5	30,5	43,5	0,4
VM-086	5,7	3,2	15,6	30,4	44,5	0,6
VM-088	5,5	4,3	15,7	20,5	53,4	0,8
VM-091	6,3	3,7	23,2	63,1	3,1	0,6
VM-094	5,0	3,1	23,0	18,9	49,2	0,7
VM-095	6,3	4,1	19,6	29,2	40,0	0,4
VM-096	6,1	4,2	18,8	45,1	25,1	0,5
VM-097	5,9	3,5	17,7	69,5	2,8	0,6
VM-098	5,6	2,8	20,4	20,1	50,5	0,8
VM-102	6,1	3,7	16,9	32,5	40,2	0,6

F5-RI-Linie	C16:0 [%]	C18:0 [%]	C18:1 [%]	C18:2 [%]	C18:3 [%]	And. [%]
VM-103	5,9	4,1	23,9	42,4	22,8	0,6
VM-105	6,4	4,0	21,7	42,6	24,7	0,4
VM-106	6,3	4,3	17,8	32,9	38,1	0,6
VM-109	6,5	2,8	16,7	31,7	41,7	0,7
VM-114	6,7	2,6	15,8	50,0	24,3	0,5
VM-116	6,7	3,9	19,5	32,3	36,9	0,5
VM-119	6,1	3,7	19,8	41,8	28,0	0,5
VM-120	6,2	3,2	21,7	54,1	14,2	0,6
VM-122	6,7	4,2	18,4	39,3	30,9	0,5
VM-125	7,0	4,0	20,1	31,5	36,8	0,5
VM-126	6,0	3,7	18,0	46,3	25,6	0,8
VM-127	7,4	3,9	16,8	20,8	50,7	0,5
VM-128	6,1	4,2	15,1	70,7	3,5	0,7
VM-132	6,2	4,2	19,2	34,4	35,6	0,8
VM-133	6,5	3,1	19,5	22,8	47,6	0,6
VM-134	6,5	3,1	17,2	19,1	53,6	0,5
VM-135	7,2	3,4	19,5	40,9	28,5	0,6
VM-137	6,7	2,2	16,5	35,5	38,4	0,5
VM-139	5,8	3,7	15,5	37,6	36,8	0,7
VM-141	6,6	3,5	16,3	58,9	14,1	0,6
VM-142	7,1	3,5	16,7	37,5	34,7	0,4
VM-143	7,0	3,7	18,3	32,6	38,0	0,7
VM-147	7,2	2,7	17,8	67,4	4,3	0,6
VM-149	6,0	3,6	21,7	40,0	28,2	0,6
VM-151	5,8	2,5	17,3	19,3	54,6	0,7
VM-152	6,3	2,5	15,4	53,1	22,1	0,7
VM-153	6,2	3,7	16,5	66,1	7,0	0,6
VM-154	6,3	3,3	16,7	53,3	19,9	0,6
VM-156	5,9	3,4	19,2	38,0	32,8	0,5
VM-158	6,0	3,7	17,2	22,7	49,9	0,6
VM-159	5,9	3,8	18,6	21,2	50,0	0,6
VM-160	5,9	4,8	22,7	29,6	36,5	0,5
VM-162	6,2	3,8	17,4	33,2	38,7	0,6
VM-164	6,2	2,7	14,3	41,2	35,2	0,8
VM-166	5,6	3,5	20,1	25,2	45,0	0,8
VM-172	6,2	2,7	17,6	36,1	36,8	0,7
VM-173	7,2	2,8	15,8	32,9	40,8	0,5
VM-176	6,5	3,1	19,2	30,8	39,9	0,5

## 9 LEBENS LAUF

**Name:** Michael Klocke  
**Anschrift:** Limberger Straße 23, 49080 Osnabrück  
Von-Siemens-Straße 3c, 48291 Telgte  
**Geburtsdatum:** 6. Mai 1971  
**Geburtsort:** Berlin  
**Staatsangehörigkeit:** deutsch  
**Familienstand:** ledig

### Schulbildung

01.08.77 - 31.07.81 Thomas-Morus-Schule, Münster  
01.08.81 - 22.05.90 Pascalgymnasium, Münster  
(Abschluß: Allgemeine Hochschulreife)

### Studium

14.09.90 - 27.03.96 Studium der Biologie  
Westfälische Wilhelms-Universität, Münster  
(Abschluß: Biologie-Diplom)  
(01.08.95 - 27.03.96) Diplomarbeit am Institut für Ökophysiologie der Pflanzen, WWU Münster  
Thema der Diplomarbeit: ‚Einfluß von Dürrestreß, Temperatur- und Lichtregime auf Photosynthese, Säurestoffwechsel und Wasserhaushalt von *Crassula lycopodioides* L.‘

### Berufliche Tätigkeiten

01.10.96 - 31.12.99 Wissenschaftlicher Mitarbeiter  
Lehrstuhl für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung  
Technische Universität München  
seit 01.05.00 Wissenschaftlicher Mitarbeiter  
Fachbereich Biologie/Chemie – Pflanzenphysiologie  
Universität Osnabrück