

# **QTL-Analyse der Backqualität in Einkornweizen (*T.m.monococcum*)**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität

vorgelegt von

Bärbel Taenzler

aus Krefeld

Düsseldorf 2000

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

Referent: Prof. Dr. P. Westhoff  
Koreferat: Prof. Dr. W. Martin  
Prof. Dr. F. Salamini

Tag der mündlichen Prüfung: 31.5.2001

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>III</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Molekulare DNA-Analysemethoden	3
1.1.1. Isoenzym-Marker	3
1.1.2. RFLP-Marker	3
1.1.3. PCR-basierende Marker	4
1.2. Statistische Genomanalyse	6
1.2.1. MAPMAKER	7
1.2.2. JoinMap	7
1.3. QTL-Analyse	9
1.3.1. Lineare Regressionsanalyse	9
1.3.2. Intervallkartierung	10
1.3.3. Kombination aus Intervallkartierung und multipler, linearer Regression	11
1.3.4. Anwendungsgebiete der QTL-Analyse	14
1.4. Bedeutung und Abstammung des Brotweizens <i>T. aestivum</i>	14
1.5. Herkunft und Eigenschaften des Einkornweizens <i>T. monococcum</i>	17
1.6. Bestimmung und Ursachen der Backqualität	19
1.7. Charakterisierung des Einkornweizens auf agronomische, rheologische, morphophysiologische und phylogenetische Merkmale	22
1.8. Thema der Arbeit	23
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>25</b>
2.1. Material	25
2.1.1. Pflanzenmaterial	25
2.1.2. Genbibliotheken	26
2.1.3. Chemikalien, Enzyme und Antibiotika	26
2.1.4. Lösungen und Medien	26
2.2. Methoden	27
2.2.1. Genotypisierung	27
2.2.1.1. DNA-Isolation	27
2.2.1.2. AFLP-Analyse	28
2.2.1.3. RFLP-Analyse	29
2.2.2. Genkarten-Kalkulation	32
2.2.3. Bestimmung der Backqualität	34
2.2.3.1. SDS-Sedimentationstest	34

2.2.3.2. Bestimmung des Proteingehaltes	35
2.2.4. QTL-Analyse	35
2.2.5. Analyse der Glutenine	36
2.2.6. Analyse des Merkmals "freidreschend"	36
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>37</b>
3.1. Genotypisierung der Populationen 1 und 2 mit AFLP- und RFLP-Markern	37
3.2. Analyse der Backqualität	51
3.3. QTL-Analyse	53
3.3.1. Markerrahmen für die QTL-Berechnung	53
3.3.2. Lokalisierung der QTLs für die Backqualität	55
3.3.2.1. QTL auf Chromosom 1	56
3.3.2.2. QTL auf Chromosom 3	58
3.3.2.3. QTL auf Chromosom 5	59
3.4. Kartierung der Gluteninallele	62
3.5. Kartierung des Merkmals "freidreschend"	64
<b>4. Diskussion</b>	<b>65</b>
4.1. Genkarten der sieben Einkornchromosomen	65
4.2. QTLs für die Backqualität	68
4.3. Korrelation der QTLs für die Backqualität mit möglichen Kandidatengenen	70
4.4. Kartierung des Merkmals "freidreschend"	72
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>73</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>75</b>

Die Arbeit ist unter der Adresse [www.ulb.uni-duesseldorf.de/diss/matnat/2001/taenzler.html](http://www.ulb.uni-duesseldorf.de/diss/matnat/2001/taenzler.html) im Internet abrufbar.

## Abkürzungsverzeichnis

AFLP	Amplifizierter Fragment Längen Polymorphismus
A-PAGE	"Acid-Poly Acrylamid Gel Electrophorese"
BQ	Backqualitäts Quotient
CI	"Confidence Interval"
cM	centi Morgan
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
HMW-GS	"High Molecular Weight Glutenines"
kb	Kilobasenpaare
LMW-GS	"Low Molecular Weight Glutenines"
LOD	"Likelihood of the ODDs"
PCR	"Polymerase Chain Reaction"
QTL	"Quantitative Trait Locus"
RAPD	"Random Amplified Polymorphic DNA"
RFLP	Restriktions Fragment Längen Polymorphismus
RP-HPLC	"Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography"

## 1. Einleitung

Das äußere Erscheinungsbild eines Organismus setzt sich aus einer großen Anzahl von Merkmalen zusammen, die teilweise morphologischer, teilweise physiologischer Natur sind. Diese Merkmale sind kontinuierlich und werden an die Nachkommen von Generation zu Generation weitergegeben. Lange Zeit ist man davon ausgegangen, daß die Weitergabe an die Nachkommen in Form einer Kopie des Organismus selbst geschieht, bis man erkannte, daß der Ausgangsorganismus Erbmaterial bereitstellt, das die Informationen für die Neubildung eines Tochterorganismus enthält.

Daß dieses Erbmaterial in Genen organisiert ist, wurde erstmals durch Kreuzungsexperimente von Gregor Mendel Mitte des neunzehnten Jahrhunderts aufgedeckt, der darauf basierend die heute als Mendelsche Regeln bezeichneten Gesetzmäßigkeiten aufstellte (Correns 1905, diskutiert in Orel 1996). Seine Theorie besagt, daß Merkmale einzeln und unabhängig voneinander an die Nachkommen weiter gegeben werden und daß sie dabei unverändert bleiben. Er erkannte, daß sich die von den Eltern weitergegebenen Charaktere in der F<sub>2</sub>-Generation im Verhältniss 1:2:1 spalten und daß die manchmal auftretende Spaltung 3:1 durch dominante Allele verursacht wird und in Wahrheit auch eine 1:2:1-Spaltung ist. Mendel führte die Bezeichnung und Unterscheidung dominanter, bzw. rezessiver Allele durch große, bzw. kleine Buchstaben ein und widersprach u.a. damit der Theorie Charles Darwins, der kontinuierliche Variation als Basis für natürliche Selektion betrachtete. Die Einheit der genetischen Information, die für die Realisation einzelner Merkmale verantwortlich ist, nennt Mendel "Gen" und bezeichnet deren Gesamtheit als Genotyp eines Organismus.

Gene können in verschiedenen Konfigurationen vorkommen, die zu einer Abwandlung des kodierten Merkmals führt. Die unterschiedlichen Konfigurationszustände eines Gens werden als Allele bezeichnet. Liegen bei einem Organismus die Allele homologer, also das gleiche Merkmal realisierender Gene in der gleichen Konfiguration vor, spricht man von einem homozygoten Merkmal/Organismus. Unterscheiden sich die Konfigurationen homologer Gene, ist der Organismus/das Merkmal heterozygot.

Heute wissen wir, daß Nukleinsäuren die Träger der genetischen Information sind. Der Großteil der genetischen Information höherer Organismen ist in den Chromosomen organisiert, deren Gesamtheit man als Genom bezeichnet. Die Sequenz der vier verschiedenen Basen der Nukleinsäure ist die Basis für eine komplexe und differenzierte Bildung unterschiedlichster Proteine, die für Zellaufbau, Stoffwechsel, Differenzierung und Reproduktion verantwortlich sind. Ein Gen ist dabei für die Bildung eines Proteins verantwortlich, das dann nicht selten mit

anderen Proteinen gemeinsam die Ausbildung eines einzigen Merkmals kontrolliert (Polygenie), andererseits aber auch für die Ausbildung verschiedener Merkmale verantwortlich sein kann (Pleiotropie).

Die Funktionseinheit "Gen" eines eukaryotischen Organismus ist unter die Kontrolle von Promotor- und Enhancer-Regionen gestellt, die abhängig von Zeitpunkt und Gewebe die Transkription des Gens aktivieren und somit für die Ausbildung eines Merkmals sorgen.

Bei der Beobachtung natürlicher Populationen tritt jedoch ein Konflikt zwischen der Mendelschen Theorie, daß Merkmale einzeln vererbt werden, und der Tatsache auf, daß die meisten Merkmale eine kontinuierliche Variabilität zeigen, die auch von Darwin beobachtet wurde und deren Ursache er mit einer "vermischten" Vererbung der Merkmale erklärte. Mit Hilfe molekularer Techniken konnte aufgedeckt werden, daß sich die Theorien von Mendel und Darwin nicht widersprechen, sondern daß die Darwinsche Variation auf die Mendelsche reduziert werden kann. Die kontinuierliche Vererbung von Merkmalen ist abhängig von der Segregation multipler genetischer Faktoren, die durch Umwelteinflüsse noch modifiziert werden. Die genetischen Faktoren, die Einfluß auf ein Merkmal nehmen, werden als QTLs ("Quantitative Trait Loci") bezeichnet. Je nach Anzahl und Eigenschaft der Allele eines Individuums ist die Ausprägung des Merkmals mehr oder weniger deutlich.

Nach Analyse zahlreicher kontinuierlich verteilter Merkmale in kultiviertem Getreide konnte jedoch festgestellt werden, daß die Anzahl der QTLs, die Einfluß auf ein Merkmal nehmen offenbar relativ gering ist (Phillips und Vasil, 1996; Paterson, 1998; Beispiele in Schäfer-Pregl *et al.* 1998; Leonards-Schippers *et al.* 1994). Überraschend ist auch die Tatsache, daß in kultivierten Linien mit einer schwachen Ausprägung eines definierten Merkmals trotz allem eine relativ hohe Anzahl positiver Allele vorhanden sein können, ebenso wie in Wildtyp-Linien (Tanksley und McCouch, 1997). Der Einfluß von QTLs auf Merkmale ist offenbar unterschiedlich, so daß eine Vielzahl QTLs nur einen geringen Effekt besitzen, während einige wenige zu starken Merkmalsänderungen führen können.

Bei der Analyse der QTLs konnte man nicht mehr mit der klassischen Mendelschen Technik arbeiten, da die Merkmale nicht mehr getrennt vererbt wurden, sondern eine kontinuierliche Verteilung zeigten. Eine Identifizierung der beteiligten Loci war und ist nur über die Verwendung statistischer Methoden zu erreichen, die nicht nur Auskunft über die Anzahl der relevanten QTLs, sondern auch über deren Einfluß auf das Merkmal geben können.

Zunächst war eine Identifizierung von QTLs mangels effektiver DNA-Analyse-Methoden schwierig. Vor der Einführung molekularer Marker wurde die DNA mittels morphologischer Marker untersucht. Ziel war dabei, ein sichtbares Merkmal zu finden, das mit dem gewünschten Allel eines physiologischen oder spät sichtbar werdenden Merkmals, wie z.B. Resistenzen, Pflanzhöhen oder Samengrößen, kosegregiert (Sax, 1923; Breese und Mather, 1957; Smith, 1937). Damit konnte das gewünschte Allel schnell und einfach identifiziert werden.

Die Tatsache, daß mehrere Loci Einfluß auf ein Merkmal hatten, machte die Identifizierung aller einflußnehmenden Allele durch einen morphologischen Marker unmöglich. Außerdem war aufgrund einer geringen Verfügbarkeit morphologischer Marker die Abdeckung des gesamten Genoms und damit eine genaue Lokalisierung des Merkmals nicht gegeben. Die Entwicklung molekularer Marker hat zur Lösung beider Probleme beigetragen.

## 1.1 Molekulare DNA-Analysemethoden

### 1.1.1 Isoenzym-Marker

Die ersten molekularen Marker waren Isoenzyme. Komplexe Gemische von Proteinen wurden in Stärkegelen durch Zonenelektrophorese aufgetrennt und geringe Unterschiede in der Molekülstruktur von Isoenzymen sichtbar gemacht (Hunter und Markert, 1957; Smithies, 1955). Wie bei den morphologischen Markern wurde dabei nach Kosegregation diesmal zwischen Molekülstruktur des Isoenzym und Merkmal gesucht. Jedoch war auch hier die Anzahl der verfügbaren Enzymaktivitätsfärbungen begrenzt und eine Abdeckung des gesamten Genoms nicht möglich.

### 1.1.2 RFLP-Marker

Botstein *et al.* (1980) haben den ersten DNA-basierenden Marker entwickelt. Der Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus-Marker (RFLP-Marker) ist ein molekularer Marker, der die Abdeckung des gesamten Genoms ermöglicht. Genomische DNA wird mit Restriktionsenzymen geschnitten, die Fragmente durch Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Membran übertragen. Die auf der Membran befindliche DNA wird dann mit kurzen, radioaktiv markierten DNA-Sonden hybridisiert. Sind die genomischen DNA-Fragmente, welche die mit der Sonde korrespondierende Sequenz tragen, durch Verschiebung oder Wegfall der Restriktionsschnittstelle, oder durch Insertion, oder Deletion von DNA-Blocks zwischen zwei Individuen

verschieden, wird dieser Unterschied als Fragment-Längen-Polymorphismus sichtbar. Genaue Kenntnisse über die Beschaffenheit von Loci sind dafür nicht nötig. RFLP-Marker sind kodominant. Sie beinhalten Informationen über den genauen genetischen Hintergrund am Locus des Markers, der durch ein Bandenmuster sichtbar gemacht wird (siehe Abb.8, Seite 44). Ein Merkmal kann auf Kosegregation mit diesem Bandenmuster überprüft und so ein gekoppelter Marker identifiziert werden.

Die Abdeckung des gesamten Genoms, die durch diese Methode ermöglicht wird, läßt zum ersten Mal eine Erstellung von Genkarten und damit eine genaue Lokalisierung von Genen und QTLs im Genom verschiedener Individuen zu. Dafür werden die Markerreihenfolgen anhand der Rekombinationsereignisse untereinander berechnet (siehe 1.2).

### 1.1.3 PCR-basierende Marker

Die 10 Jahre später entwickelten Methoden für PCR-basierende Marker haben den RFLP-Markern gegenüber den Vorteil, daß sie in kürzerer Zeit mit geringerem genetischen Ausgangsmaterial mehr Polymorphismen aufdecken und so eine feinere Kartierung von Genen ermöglichen. Sie beruhen alle auf der Amplifizierung von DNA-Abschnitten mit Hilfe der PCR ("Polymerase Chain Reaction"). Die benötigten Primer sind je nach Methode verschieden.

#### *RAPD-Marker*

Bei den RAPD-Markern ("Random Amplified Polymorphic DNA") sind die Primer von beliebiger Sequenz. Es werden mit einer Sorte Primer pro Ansatz zufällige DNA-Fragmente amplifiziert. Fragmentlängenpolymorphismen werden, wie bei RFLP-Markern durch Verschiebung oder Wegfall einer Primeranlagerungsstelle, oder Deletion oder Insertion von DNA-Blocks zwischen zwei Primern verursacht und durch Gelelektrophorese sichtbar gemacht (Williams *et al.* 1990).

#### *Mikrosatelliten-Marker*

Die Mikrosatelliten-Marker machen sich die repetitiven Sequenzen in eukaryotischen Genomen, je nach Größe als Mini- oder Mikrosatelliten bezeichnet, zunutze. Mini- oder Mikrosatelliten bestehen aus sich wiederholenden Sequenzen von zwei bis vier Nukleotiden, die sich über das gesamte Genom verteilen und hoch konserviert sind. Für die molekulare Genomanalyse werden sie mit Primern, deren Sequenz sich zum einen aus repetitiven Bereichen und zum anderen aus zufälligen Basensequenzen zusammensetzt, amplifiziert und Unterschiede in der Länge der genomischen repetitiven Bereiche auf diese Weise sichtbar gemacht. Mikrosatelliten liegen

nicht in relevanten Bereichen, flankieren aber häufig kodierende DNA-Sequenzen (Kochert, 1994). Damit können zwei Mikrosatelliten ein Gen identifizieren (Weber und May, 1989).

*AFLP-Marker*

Von Vos *et al.* (1995) wurde die "Amplified Fragment Lenght Polymorphism"-Methode (AFLP-Methode) entwickelt, die auf der Amplifizierung von Restriktionsfragmenten basiert.

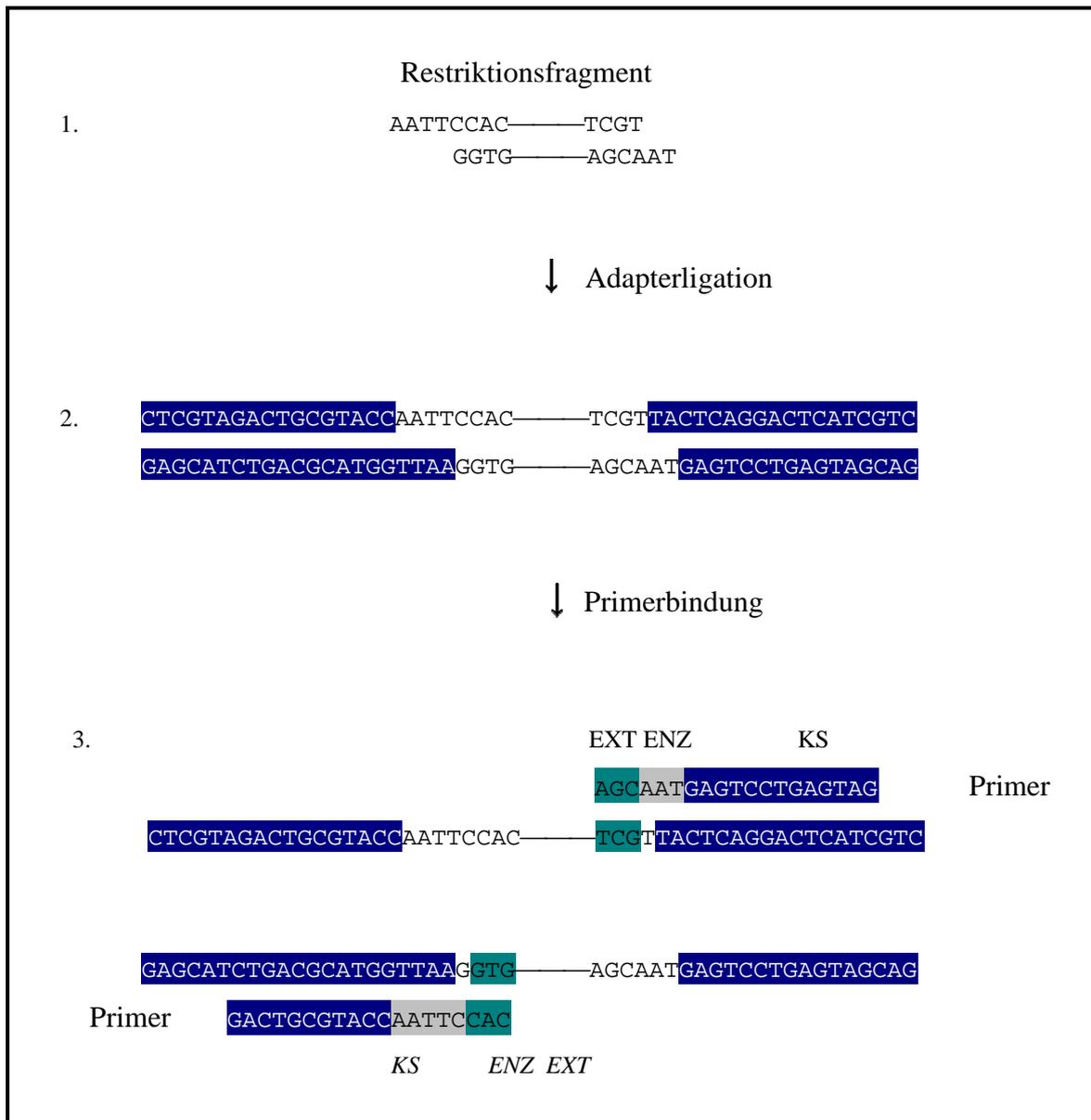


Abb1: Schematische Darstellung der AFLP-Technik. Die Schritte vom Fragment (1.) über das Ligationsprodukt (2.) bis zur Primerbindung (3.) sind am Beispiel eines EcoRI/ MseI-Fragmentes dargestellt. Adapter, selektive Sequenz und die verschiedenen Primerregionen (Kernsequenz KS, enzym-spezifische Sequenz ENZ und selektive Verlängerung EXT) sind farbig unterlegt.

Dafür wird die genomische DNA im ersten Schritt mit Restriktionsenzymen geschnitten. An die Schnittstellen der Fragmente werden enzymspezifische Adapter ligiert, die als Anlagerungsstelle für die Primer dienen.

Die Amplifizierung der Fragmente verläuft in zwei Stufen: 1. Präamplifizierung 2. Amplifizierung. Die bei der Präamplifizierung und Amplifizierung verwendeten Primer bestehen aus drei Komponenten. Sie besitzen eine **Kernsequenz (KS)**, die korrespondierend zu der Adaptersequenz ist, eine **enzym-spezifische Sequenz (ENZ)** und eine **selektive Verlängerung (EXT)**. Die selektive Verlängerung besteht bei den Primern für die Präamplifizierung aus einer, bei der Amplifizierung aus drei selektiven Basen. Entsprechend werden also nur Fragmente amplifiziert, deren erste, bzw. ersten drei Basen nach der Enzymschnittstelle mit den selektiven Basen des Primers korrespondieren.

Um die Fragmente sichtbar zu machen, wird bei der Amplifizierung einer der Primer radioaktiv markiert. Die amplifizierten Fragmente werden anschließend über ein denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Signale der radioaktiv markierten und amplifizierten Fragmente auf einem Röntgen- oder Phosphorimagerfilm aufgefangen (Abb.7, Seite 37).

Diese Methode zeichnet sich durch ihre effektive Anwendbarkeit und sichere Reproduzierbarkeit aus. Allerdings sind AFLP-Marker dominante Marker, die in einer F<sub>2</sub>-Population über die Homozygotie zu lediglich einem Elter Auskunft geben. Alle zu diesem Elter nicht homozygoten Nachkommen sind entweder homozygot zum anderen Elter, oder heterozygot. Dieser Informationsnachteil der AFLP-Marker wird aber durch die oben genannten Vorteile ausgeglichen.

Alle hier beschriebenen Markerformen dienen einer detaillierten Analyse des Genoms. Sie werden genutzt, um Gen- oder QTL-Positionen im Genom zu lokalisieren, mögliche Kandidatengene zu identifizieren und deren Struktur aufzuklären. Die dafür notwendigen Berechnungen der Markerreihenfolgen beruhen auf den Mendelschen Vererbungsregeln und einer Kalkulation der Rekombinationshäufigkeiten zwischen den einzelnen Markern. Sie werden aufgrund ihres Umfangs mit Hilfe statistischer Computerprogramme durchgeführt, von denen zwei im folgenden Kapitel dargestellt werden.

## 1.2 Statistische Genomanalyse

Bei der statistischen Analyse der molekularen Ergebnisse werden anhand von Rekombinationshäufigkeiten die Reihenfolge der Marker und ihre Abstände zueinander berechnet. Je häufiger

zwei Marker durch einen Rekombinationsvorgang während der Meiose getrennt werden, desto weiter sind sie voneinander entfernt. Mit Hilfe von Kartierungsfunktionen, werden die Rekombinationshäufigkeiten in centi Morgan umgerechnet. Ein centi Morgan ist das Maß für den Abstand zweier Gene/Marker die mit einer Wahrscheinlichkeit von 1% durch genetische Rekombination voneinander getrennt werden. Abhängig von der Genomgröße bedeutet das bei Arabidopsis einen Abstand von etwa 139kb (Kotani *et al.* 1999) und beim Menschen von 1108kb (Stoddart *et al.* 1999). Die Berechnung der centi Morgan-Einheiten erfolgt durch die Kartierungsfunktionen von Haldane oder Kosambi.

### 1.2.1 MAPMAKER

Ein für diese Berechnung häufig verwendetes Programm ist MAPMAKER, das von Lander *et al.* (1987) entwickelt wurde. Dabei werden die Marker im ersten Schritt mittels Zweipunktanalyse verschiedenen Kopplungsgruppen, welche die Chromosomen oder Teile von ihnen representieren zugeordnet. Ob ein Marker zu einer Kopplungsgruppe gehört oder nicht, wird anwenderdefiniert anhand des berechneten LOD-Wertes bestimmt. Der LOD-Wert ("Likelihood of the ODs") ist der Logarithmus des Quotienten aus der Wahrscheinlichkeit für die Kopplung zweier Marker und der Wahrscheinlichkeit ihrer "Nichtkopplung". Die Berechnung der LOD-Werte beruht bei MAPMAKER auf dem Lander-Green-Algorithmus. Wird ein Marker bei einem LOD-Wert von 3,0 einer Kopplungsgruppe zugeordnet, bedeutet das, daß es 1000mal wahrscheinlicher ist, daß er zu dieser Kopplungsgruppe gehört, als das er nicht dazu gehört.

Die Bestimmung der Markerreihenfolge innerhalb der Kopplungsgruppen beginnt mit einer Untergruppe aus fünf Markern. Die wahrscheinlichste Reihenfolge dieser fünf Marker wird, basierend auf einer Mehrpunktanalyse, berechnet und als Startreihenfolge verwendet, wenn sie 1000fach wahrscheinlicher ist, als die nächstwahrscheinliche Reihenfolge. Zu dieser Startreihenfolge werden alle folgenden Marker addiert. Auch diese Addition erfolgt auf Basis einer Mehrpunktanalyse.

### 1.2.2 JoinMap

Das für diese Arbeit verwendete Programm heißt JoinMap und wurde von Stam und Van Ooijen (1995) entwickelt. Ein wichtiger Vorteil dieses Programmes ist dessen Möglichkeit, Ergebnisse aus verschiedenen Kartierungsexperimenten zu verwenden.

Für die Konstruktion einer gemeinsamen Genkarte werden zunächst die Rekombinationshäufigkeiten zwischen Markern jedes Einzelexperimentes berechnet. Die paarweisen Daten werden anschließend in einer Datei zusammengefügt und die LOD-Werte (s.o.) auf Basis einer Zweipunktanalyse berechnet. Im Unterschied zu MAPMAKER wird für die Berechnung der LOD-Werte der Chi-Quadrat-Test verwendet, der unabhängig von der Segregation der Marker und damit auch unabhängig von Segregationsstörungen ist.

Anhand der berechneten LOD-Werte werden Marker Kopplungsgruppen zugeordnet und Markeranordnung und -abstände auf Basis der Zweipunktanalyse berechnet. Die Festlegung der Markerreihenfolge beginnt mit einem Markerpaar, dessen Abstand anhand der Rekombinationshäufigkeit berechnet wird. Der als nächstes zu addierende Marker wird anhand der LOD-Werte der noch nicht addierten Marker unter Berücksichtigung der schon platzierten Marker ausgewählt. Für den neuen Marker wird die wahrscheinlichste Position ohne Veränderung der schon bestehenden Reihenfolge bestimmt.

Nimmt die Wahrscheinlichkeit der Gesamtkarte durch den neu platzierten Marker um einen anwenderdefinierten Wert ("jump-threshold") ab, wird der Marker nicht addiert, sondern später noch einmal getestet. Nach einer bestimmten, ebenfalls anwenderdefinierten Anzahl Markeradditionen (ripple-value) wird die Karte durch Ausprobieren neu geordnet. Diese Neuordnung basiert auf einer Dreipunktanalyse. Dabei wandert ein "Fenster", in dem sich drei Marker befinden vom Anfang der Karte bis zum Ende und die wahrscheinlichste Markerreihenfolge innerhalb dieses Fensters wird kalkuliert. Nach der Addition aller möglichen Marker werden die centi Morgan-Abstände berechnet und anschließend die Kartenwahrscheinlichkeit kalkuliert.

Die so berechneten Genkarten, welche die molekularen Marker in ihre genetische Reihenfolge bringen, können dazu benutzt werden, um QTLs zu lokalisieren und ihren Einfluß auf das Merkmal zu determinieren. Dafür müssen zunächst die Merkmalswerte der einzelnen  $F_2$ -Individuen oder deren  $F_3$ -Familien bestimmt werden und diese dann in Bezug zu ihrem genetischen Hintergrund gebracht werden. Die Berechnung der QTLs kann mit verschiedenen statistischen Methoden erfolgen, deren Vor- und Nachteile im folgenden Kapitel dargestellt werden.

### 1.3 QTL-Analyse

In vielen Bereichen, wie z.B. der Medizin oder der Pflanzen- und Tierzüchtung ist das Wissen um die Tatsache, daß viele Merkmale quantitativ vererbt werden, wichtig, da für die Analyse oder gezielte Vererbung eines Merkmals nach Möglichkeit alle Allele identifiziert und lokalisiert werden müssen.

Die Identifizierung der QTLs ist mit der Entwicklung verschiedener statistischer Methoden in der quantitativen Genetik gelungen. Nach einer QTL-Analyse kann so im Züchtungsbereich eine markerunterstützte Selektion angewendet werden, die eine beschleunigte Anreicherung positiver Allele ermöglicht (Gimelfarb und Lande, 1995). Marker, die sich in der Nähe von QTLs befinden, können zum "Map Based Cloning" verwendet werden und damit eine Identifizierung z.B. möglicher defekter Gene in der medizinischen Forschung ermöglichen (Tanksley *et al.* 1995).

#### 1.3.1 Lineare Regressionsanalyse

Die erste Methode zur QTL-Identifizierung war die einfache lineare Regression (Soller und Brody, 1976). Dabei wird die Markerzusammensetzung geprüft und ein Unterschied in den Merkmalswerten untersucht. Es wird immer nur ein Marker zu einem Zeitpunkt betrachtet. Eine genaue Lokalisierung der QTLs ist mit dieser Methode unmöglich, da ein großer Abstand zu einem QTL nicht von einem kleinen phenotypischen Effekt unterschieden werden kann. Außerdem lassen sich so nur Markerloci untersuchen, nicht aber ihre Zwischenräume. Das Gen kann nur identifiziert werden, wenn Marker und QTL gekoppelt vorliegen. Außerdem ist die Identifizierung bei QTLs mit kleinem Effekt schwierig, da diese durch QTLs mit größerem Effekt überdeckt werden können. Mehrere QTLs auf einem Chromosom können nicht unterschieden werden und ihre Identifizierung führt zu einer Verschiebung der wahren Position der einzelnen QTLs.

Um diese Schwierigkeiten zu überwinden, wurden andere Methoden zur QTL-Detektion entwickelt. Heutiger Standard ist die Intervallkartierungsmethode von Lander und Botstein (1989), bei der wahrscheinliche QTL im Intervall zwischen zwei benachbarten Markern überprüft werden. Sie überwindet die Schwierigkeit der Rekombination zwischen Marker und QTL, indem Intervalle zwischen zwei benachbarten Markern analysiert werden.

### 1.3.2 Intervallkartierung

Bei der Intervallkartierungsmethode werden Intervalle zwischen benachbarten Markern auf das Vorhandensein eines QTLs untersucht. Position und Einfluß auf das aktuelle Merkmal werden anhand von LOD-Werten, die denen der Kopplungsanalyse von Lander *et al.* (1987) entsprechen, an jedem Punkt des Genoms berechnet. Die dafür notwendige Information über die genetische Zusammensetzung des QTLs wird anhand der Genotypen der flankierenden Marker und der QTL-Position abgeschätzt. Konfidenzintervalle (CIs) berechnen sich bei dieser Methode aus der Abnahme der LOD-Werte beiderseits des Maximums der Wahrscheinlichkeitskurve über das Genom. Der Bereich, in dem die LOD-Werte um den Wert eins fallen, gibt das Konfidenzintervall an, in dem sich der QTL mit einer Wahrscheinlichkeit von 96,5% befindet.

Der Vorteil dieser Methode gegenüber der linearen Regression ist die Möglichkeit, die Rekombination zwischen molekularem Marker und QTL zu kompensieren. Hat zwischen zwei Markern keine Rekombination stattgefunden, ist der Genotyp zwischen den Markern, bei Nichtbeachtung der doppelten Rekombinationsereignisse, bekannt. Die beiden Marker können dann als ein Marker angesehen werden, der eng mit dem QTL gekoppelt ist. Die Information, welche die Marker bei dieser Analysemethoden tragen, ist im Vergleich zur Methode der linearen Regression erhöht. Dadurch ist es möglich, QTLs effektiv aufzudecken und das Vorkommen falschpositiver QTLs, d.h. solche, die in Wirklichkeit nicht existieren, zu limitieren. Außerdem lassen sich die phenotypische Effekte des QTLs akkurater einschätzen und die benötigte Anzahl Nachkommen reduzieren.

Durch die hohe Komplexität der Methode ist es jedoch problematisch, multiple QTLs aufzudecken. Es lassen sich nur Ein-QTL-Modelle effektiv berechnen, was zu einer Reihe von Nachteilen führen kann. Falls sich mehrere QTLs auf einem Chromosom befinden, kann die detektierte Position eines QTLs verschoben sein (Knott und Haley, 1992; Zeng, 1994; Lander und Botstein 1989; Martinez und Curnow, 1992). Dadurch, daß die Information der übrigen, nicht-flankierenden Marker ungenutzt bleibt, ist eine genaue Einschätzung des QTL-Einflusses auf das Merkmal schwierig, da Einflüsse anderer QTLs bei der Intervallkartierungsmethode nicht berücksichtigt werden. Das kann unter Umständen auch zur Identifizierung eines QTLs in einem Intervall führen, der dort nicht vorhanden ist, wenn sich im benachbarten Intervall ein QTL befindet (Zeng, 1994). Möglich ist außerdem, daß gekoppelte QTLs mit gegenteiligem Effekt nicht identifiziert werden und gekoppelte QTLs mit additivem Effekt nicht unterschieden werden, sondern als ein QTL erkannt und dessen Position zwischen den gekoppelten QTLs angegeben wird (Jansen, 1996).

Um diese Probleme zu kompensieren, müssen die Einflüsse der nicht im untersuchten Intervall befindlichen QTLs mit berechnet werden, ohne daß der rechnerische Aufwand zu groß wird. Das ist durch eine Kombination der Intervallkartierungsmethode mit der Methode der multiplen linearen Regression möglich.

### 1.3.3 Kombination aus Intervallkartierung und multipler linearer Regression

Für die Kombination aus multipler linearer Regression und Intervallkartierung gibt es verschiedene Ansätze (Haley und Knott, 1992; Zeng, 1993; Zeng, 1994; Jansen, 1992, 1993). Die Unterschiede bestehen zwischen den Algorithmen, die teilweise eine Intervallkartierung unter Nutzung nichtgekoppelter Marker als Kofaktoren darstellen, teilweise aber den Schwerpunkt auf der multiplen linearen Regression haben und die wahrscheinlichste QTL-Position durch die Berechnung von Regressionskoeffizienten unter Nutzung flankierender Marker bestimmen.

#### *MQM-Kartierung*

Bei dem Modell von Jansen (1993) und Jansen und Stam (1994) handelt es sich um eine Intervallkartierungsmethode bei der ein Ein-QTL-Modell unter Verwendung weiterer Marker als Kofaktoren zur Eliminierung der Effekte zusätzlicher QTLs berechnet wird. Es wird als MQM-Kartierung (Marker-QTL-Marker-, oder Multiples-QTL-Modell-Kartierung) bezeichnet. Die Methode verläuft in zwei Schritten.

Beim ersten Schritt wird das quantitative Merkmal durch multiple Regression auf die Marker zurückgeführt. Dabei werden Marker identifiziert, die sich in der Nähe von QTLs befinden. Diese Marker werden selektiert und als Kofaktoren bei der anschließenden Intervallkartierung verwendet. Der zweite Schritt ist die Intervallanalyse. Dabei werden verschiedene Modelle (Ein-, Zwei-, Kein-QTL-Modell) innerhalb eines Intervalls auf ihre Wahrscheinlichkeit hin überprüft. Der Einfluß der möglichen übrigen QTLs geht als Funktion der korrelierten Marker im Algorithmus für die Wahrscheinlichkeitsrechnung ein. Die Position des QTLs im Intervall wird genau, die der QTLs außerhalb des Intervalls nur ungefähr bestimmt. Das ist ausreichend, um den Einfluß der nicht im Intervall befindlichen QTLs zu reduzieren.

Die fehlende genetische Information am QTL wird durch ein Iterationsverfahren komplettiert. Dafür werden Informationen vom Phänotyp des QTL und der Genotypen der flankierenden Marker verwendet. Durch gewichtete Regression des Phänotyps auf den Genotyp werden Regressionsparameter abgeschätzt, die dann wiederum zur Aktualisierung der Berechnung des

phenotypischen Einflusses des QTL verwendet werden. Diese beiden Basisschritte eines iterativen EM-Algorithmus ("Expectation Maximation"-Algorithmus) werden so lange wiederholt, bis keine Änderungen der Parameter mehr erfolgen und somit die maximal wahrscheinlichen Schätzungen erhalten worden sind.

Der Schwellenwert, bei dem ein QTL als wahrscheinlich angenommen wird, entspricht dem konservativen Wert, der auch im einfachen Intervallkartierungsverfahren angewendet wird. Durch die Kombination aus multipler, linearer Regression ist es möglich, auch zwei bis drei gekoppelte QTLs voneinander zu unterscheiden und multiple QTLs zu detektieren. Das bietet, bei Vorkommen dieser Strukturen, einen Vorteil gegenüber dem Intervallkartierungsverfahren.

#### *"Composite Interval Mapping"*

Einen anderen Ansatz der Kombination von Intervallkartierung mit multipler, linearer Regression wird von Zeng (1993 und 1994) beschrieben. Die Methode, bei der Intervalle einzeln analysiert werden und durch die Verwendung weiterer Marker als Kofaktoren unabhängig von den QTLs außerhalb des Intervalls gemacht werden, nennt sich "Composite Interval Mapping" und bietet ebenfalls die Möglichkeit, QTL-Positionen bei Vorhandensein mehrerer QTLs auf einem Chromosom genauer als bei der Intervallkartierungsmethode zu bestimmen und gekoppelte QTLs voneinander zu unterscheiden. Wie auch bei Jansen (1993) und Jansen und Stam (1994) wird hier das multidimensionale Suchproblem auf ein eindimensionales reduziert. Dabei werden jedoch alle Marker als Kofaktoren in die Berechnung der QTL-Position mit einbezogen, die im Gegensatz zu Jansen mittels Regressionsanalyse bestimmt wird.

Das Prinzip der "Composite Interval Mapping"-Methode läßt sich wie folgt darstellen: Ein Markerpaar wird benutzt, um die Testposition zu bestimmen. Gleichzeitig wird durch multiple lineare Regression der genetische Hintergrund unter Nutzung der anderen Marker kontrolliert. Dafür wird ein partieller Regressionskoeffizient berechnet, der nur von den QTLs innerhalb des Intervalls abhängig und unabhängig von allen anderen ist. Mit diesem Regressionskoeffizienten wird ein Intervalltest gemacht, der prüft, ob sich im Intervall ein QTL befindet oder nicht. Die Fragestellung der einfachen Intervallkartierungsmethode, ob sich auf dem Chromosom ein QTL befindet oder nicht, wird hierbei auf ein Intervall reduziert und ermöglicht somit eine Unterscheidung gekoppelter QTLs auf einem Chromosom.

Auch bei dieser Methode wird der unbekannte genetische Hintergrund des QTLs durch ein zweistufiges Iterationsverfahren abgeschätzt. Die Methode ist der der MQM-Kartierungsmethode sehr ähnlich, jedoch wird bei der "Composite Interval Mapping"-Methode

anstelle des EM- ein ECM-Algorithmus ("Expectation Conditional Maximation"-Algorithmus) verwendet, der im Vergleich mit dem beim MQM-Kartieren verwendeten EM-Algorithmus durch Wegfall einer Parameter-Berechnung effektiver ist, aber vergleichbare Ergebnisse liefert.

Der Schwellenwert, bei dem ein QTL als wahrscheinlich angenommen wird, berechnet sich bei der "Composite Interval Mapping"-Methode als Funktion eines genombezogenen Signifikanzwertes mit Formeln, die durch Simulationsexperimente entstanden sind.

Die Vorteile der "Composite Interval Mapping"-Methode gegenüber dem einfachen Intervallkartierungsverfahren liegen, wie beim MQM-Kartieren, in der Möglichkeit, gekoppelte QTLs zu unterscheiden, sofern sie sich nicht innerhalb eines Intervalls befinden. Hier ist eine genaue Abschätzung von QTL-Effekt und Position durch die Eliminierung des Einflusses anderer QTLs besser gegeben, als bei der einfachen Intervallkartierung, wenn es sich um ein multiples QTL-System handelt.

#### *Regressionsanalyse mit flankierenden Markern*

Eine weitere Methode zur effektiven Kartierung multipler und gekoppelter QTLs ist von Haley und Knott (1992) entwickelt worden. Der Schwerpunkt dieser Methode liegt auf der multiplen, linearen Regression, bei der die flankierenden Marker in Form von Marker-QTL-Marker-Modellen einbezogen werden. Dabei handelt es sich um Ein-QTL-Modelle, die angepaßt und mittels linearer Regression auf ihre Übereinstimmung mit der Wirklichkeit überprüft werden. Die Position, die das am besten passende Modell bezeichnet, gibt die wahrscheinlichste Position und die besten Schätzungen des Effektes des QTLs an. Die iterative Annäherung der Intervallkartierungsmethode an den Genotyp des QTLs wird hier durch die Berechnung der Regressionskoeffizienten der verschiedenen Marker-QTL-Marker-Modelle für jeden Genotyp der beiden, den QTL flankierenden Marker, ersetzt. Die Regressionskoeffizienten können an jedem Punkt des Intervalls berechnet werden.

Bei zwei oder mehreren QTLs auf einem Chromosom muß mit einem multiplen Modell gerechnet werden. Dabei kann die gleiche Methode, wie beim Ein-QTL-Modell angewendet werden, die aber in zwei oder mehr Dimensionen repliziert wird. Das ist durch die Effektivität der Methode möglich, ohne dabei zu einer zu komplexen Rechnung zu führen.

Trotz des Schwerpunktes auf der Regressionsmethode, die über Position und Effekt von QTL nur relativ ungenaue Angaben machen kann, sind die Ergebnisse bei dieser Kombinationsmethode mit den Ergebnissen der Intervallkartierung vergleichbar (Haley und Knott, 1992).

### 1.3.4 Anwendungsgebiete der QTL-Analyse

Da in natürlichen Populationen ein Großteil der genetischen Variabilität durch Variation der Allele multipler Loci bedingt ist, finden die statistischen Methoden bei der Analyse der QTLs eine Vielzahl von Anwendungen. Eine beschleunigte Züchtung von Linien, die an bestimmte Standorte gut angepasst sind oder für besondere Verwendungsmöglichkeiten gut geeignet sind, wird durch komplexe Informationen des genetischen Hintergrundes ermöglicht (Udall *et al.* 1999; Toojinda *et al.* 1998). Eine QTL-Analyse gibt Auskunft über die Anzahl beteiligter Gene und deren Einfluß auf das phenotypische Merkmal, die Genaktionen (Dominanz, Rezessivität) und pleiotropische Effekte. Sie ermöglicht die Lokalisierung agronomisch wichtiger Merkmale, wie Lagerresistenz, Ertrag, Stärkegehalt und Reifezeitpunkt (Spaner *et al.* 1999, Schäfer-Pregl *et al.* 1998) und beschleunigt die Züchtung resistenter Linien (Toojinda *et al.* 1998; Mangin *et al.* 1999; El Attari *et al.* 1998).

In dieser Arbeit ist die Backqualität von diploidem Weizen untersucht worden. Die Analyse einer F<sub>2</sub>-Population, die aus einer Kreuzung zwischen Weizen mit schlechter und guter Backqualität hervorgegangen ist, ergab eine kontinuierliche Verteilung des Merkmals und läßt so auf eine polygene Vererbung der Backqualität in dieser Pflanze schließen. Die bisherige Analyse der Backqualität beschränkte sich auf Untersuchungen spezifischer Untereinheiten und deren Variationen der Proteine, die in ihrer Gesamtheit als Prolamine bezeichnet werden und deren verschiedene Konformationen einen unterschiedlichen Einfluß auf die Backqualität haben (Gupta *et al.* 1989; Saponaro *et al.* 1995; Corbellini *et al.* 1999). Eine QTL-Analyse soll den Einfluß einer Untergruppe der Prolamine, den der Glutenine auf die Backqualität überprüfen und die Identifizierung weiterer, verantwortlicher QTLs im diploiden Weizen ermöglichen.

## 1.4 Bedeutung und Abstammung des Brotweizens *T. aestivum*

### *Bedeutung*

Innerhalb der Familie Poaceae und der Gattung *Triticum*, gehört der Weizen zum Tribus Triticeae, welche die wirtschaftlich bedeutenste Gruppe der echten Gräser darstellt. Die Triticeae werden in die beiden Untergruppen Triticinae und Hordeinae unterteilt. Die wichtigsten Gattungen der Triticinae sind *Triticum*, *Secale*, *Aegilops* und *Agropyron*, zu den Hordeinae gehört u.a. die Gattung *Hordeum*. In der Gattung *Triticum* werden diploide (Einkorn), tetraploide (Emmer) und hexaploide Arten (Dinkel, Brotweizen) zusammengefaßt.

### Abstammung

Der heutige Brotweizen *T. aestivum* ist hexaploid und ist aus Kreuzungen zwischen diploiden, bzw. tetraploiden Arten mit zueinander homoeologen Genomen entstanden. Die Grundchromosomenzahl aller Weizengenome beträgt sieben. Die Genome des Weizens werden mit A, B und D bezeichnet und stammen von den drei Vorfahren von *T. aestivum* (Abb.2).

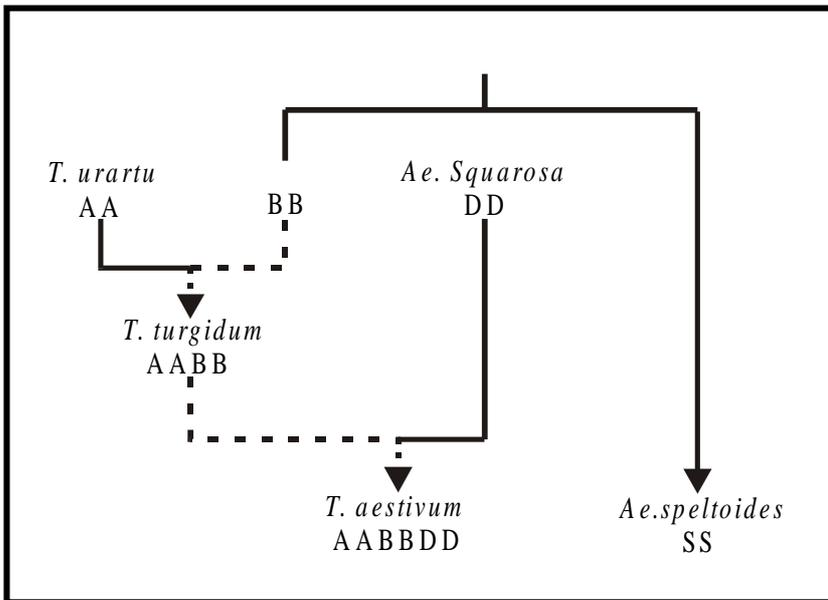


Abb.2 Schematische Darstellung der Abstammung des hexaploiden *T. aestivum*, nach Breiman und Graur (1995). Der diploide Vorfahre mit B-Genom konnte bisher noch nicht eindeutig ermittelt werden. Die Linien sind aus diesem Grund gestrichelt dargestellt.

Der Donor des A-Genoms ist mit großer Sicherheit *T. urartu* (Abb.2). Sowohl Chromosomenpaarungsexperimente, als auch neuere Untersuchungsmethoden, wie Protein- und PCR-basierende DNA-Analysen zeigen, daß das Genom von *T. urartu* große Ähnlichkeit mit dem A-Genom von *T. aestivum* aufweist, nicht aber mit dem A-Genom von *T. monococcum* und *T. boeoticum* (Breiman und Graur, 1995; Sharma und Waines, 1981; Castagna *et al.*, 1994; Sallares und Brown, 1999; Ciaffi *et al.*, 1997). Somit ist *T. urartu* wahrscheinlich einer der drei Vorläufer des hexaploiden Brotweizens, während *T. monococcum* und *T. boeoticum* zu einer anderen Spezies gehören. Kreuzungen zwischen *T. urartu* und *T. monococcum*, bzw. *T. boeoticum* führen zu nicht-fertilen Nachkommen.

Durch Hybridisierung von *T. urartu* mit dem Donor des B-Genoms ist der tetraploide Weizen *T. turgidum* (Abb.2) entstanden. Der Donor des B-Genoms ist bisher noch unbekannt. Eine mögliche Ursache dafür könnte sein, daß er sich weiterentwickelt hat, so daß er nicht mehr als Vorläufer von *T. aestivum* identifiziert werden kann. Möglicherweise ist er aber auch bisher

einfach noch nicht entdeckt worden, oder aber er existiert bereits nicht mehr. Als nächster Verwandter ist von Kerby und Kuspira (1987) und Kerby *et al.* (1990) *Ae. scarsii* vorgeschlagen worden. Eine Entwicklung der Ährenformen ist in Abbildung 3 dargestellt.



Abb.3 Entwicklung der verschiedene Ährenformen von diploidem Weizen (*Ae. squarosa* BB, *Ae. speltooides* BB, *T. urartu* AA) über den tetraploiden Weizen (*T. turgidum* AABB, *T. dicoccoides* AABB, *T. polonicum* AABB) zum heutigen hexaploiden Brotweizen (*T. aestivum* AABBDD). Mit zunehmendem Ploidiegrad ist die Zunahme der Körnergröße anhand des wachsenden Ährenvolumens zu erkennen. Der hexaploide Brotweizen besitzt eine unverzweigte Ähre, deren Ährchen dicht gepackt in zwei Reihen an der Spindel sitzen und so einen hohen Ertrag gewähren. Die Ährchen der diploiden und tetraploiden Sorten sind lockerer gepackt, bei den diploiden Weizen lediglich einreihig und tragen kleinere Körner die einen geringeren Ertrag bringen.

Der Donor des D-Genoms konnte eindeutig als *Ae. squarosa* identifiziert werden (Breiman und Graurs, 1995). Durch Hybridisierung mit *T. turgidum* ist der hexaploide *T. aestivum* mit den drei diploiden Genomen A, B und D entstanden.

Durch intensive Züchtung ist aus der Ursprungsform von *T. aestivum* über die verschiedenen Landrassen eine Vielzahl von Weizensorten mit hoher Produktivität und guten Anbaueigenschaften entstanden, die jedoch ihre genetische Variabilität eingebüßt haben. *T. monococcum*, ein naher Verwandter des A-Genom Donors *T. urartu*, hat sich diese genetische Variabilität

jedoch bewahrt und bietet so eine Quelle für viele Merkmale, die für den Anbau (agronomische Merkmale) und die Mehleigenschaften (rheologische Merkmale) interessant sind.

## 1.5 Herkunft und Eigenschaften des Einkornweizens *T.monococcum*

### *Herkunft*

Der diploide Einkornweizen *T. monococcum* stammt von *T. boeoticum* ab (Castagna *et al.*, 1994). Seine Herkunft ist monophyletisch und konnte mittels AFLP-Analyse auf die Region der Karakadağ-Berge im Südosten der Türkei festgelegt werden (Heun *et al.* 1997). Einkorn ist der erste domestizierte Weizen und damit neben Emmer und Gerste eine der ältesten Getreidesorten (Zohary und Hopf, 1993; van Zeist *et al.* 1991; Harlan und Zohary, 1966). Schon mit Beginn der Ackerbaukultur vor ca. 10 000 Jahren hatte Einkorn offenbar eine mengenmäßig geringere Bedeutung im Vergleich zu Gerste und Emmer. Es wurde meist als Breigrundlage, zur Herstellung von Flachbrot oder als Tierfutter verwendet. Wegen der Zähigkeit seiner Halme wurde sein Stroh als Baumaterial und vereinzelt im Weinbau zum Aufbinden der Reben genutzt (Harlan, 1981; Schiemann, 1948). Einkorn wurde schon ca. 5000 v.Chr. von den ertragreicheren tetra- und hexaploiden Weizensorten verdrängt (Hammer *et al.* 1997; Feldman und Sears, 1981). Die hier als *T. monococcum* und *T. boeoticum* bezeichneten Einkornweizen sind genauer gesagt Unterarten des Einkornweizens *T. monococcum* und müssten richtiger als *T. monococcum monococcum* und *T. monococcum boeoticum* bezeichnet werden. Der Einfachheit halber werden sie im Folgenden aber weiterhin *T. monococcum* und *T. boeoticum* benannt.

### *Eigenschaften*

Heute wird Einkorn nur noch in ganz vereinzelt Regionen angebaut und hauptsächlich als Tierfutter verwendet (Hammer und Perrino, 1984; Hammer und Perrino, 1995; Karagoz *et al.*, 1996; Perrino *et al.* 1996). Seine Verwendbarkeit für den Feldanbau ist beschränkt. Der Ertrag von *T. monococcum* ist nicht vergleichbar mit dem des Brotweizens, seine Teige sind oft klebrig und das Brotvolumen sehr gering (Borghini *et al.* 1996). Außerdem handelt es sich bei Einkorn normalerweise um ein Getreide mit bespelzten Körnern, die sich durch einfaches Dreschen nicht von der äußeren Hüllspelze lösen. Eine Ausnahme davon bildet *T. monococcum* var. *sinskajae*, der erstmals von Filatenko und Kurkiew (1975) beschrieben wurde (Abb.4). Es handelt sich bei diesem Einkorn-Weizen um eine freidreschende Form, deren Hüllspelze weich, einfach gekielt und nicht mit dem Korn verwachsen ist (Abb.5). Im Gegensatz dazu sind die Hüllspelzen von *T. monococcum* und *T. boeoticum* doppelt gekielt, was zu einer harten Spelze führt, die zusammen mit der Verwachsung von Korn und Spelze das Freidreschen des Kornes verhindert.



Abb.4: Ährenformen der Einkornweizen *T. monococcum*, *T. m. var. sinskajae* und *T. boeoticum* mit Einzelährchen und Körnern. Die Ähre von *T. m. var. sinskajae* ist kürzer als die des kultivierten *T. monococcum* und des wilden, spindelbrüchigen *T. boeoticum*, die Ährchen enthalten jeweils ein Korn, das aber deutlich größer ist, als die zwei Körner der beiden anderen Spezies.

Nach dem Dreschen liegen die einzelnen Ährchen zwar lose und ohne Grannen vor, das Korn ist aber immer noch von Hüll-, Deck- und Vorspelze ummantelt. Versucht man das Korn von den Spelzen durch stärkeres Dreschen zu trennen, zerbricht das Korn und ist damit für eine weitere Verwendung unbrauchbar.

Trotz dieser für Anbau und Verwertung schwierigen Eigenschaften ist Einkorn heute aber, u.a. wegen seines hohen Protein- und Carotingehaltes und spezieller Prolamine ein interessanter Kandidat für die Herstellung neuer, diätetischer Nahrungsmittel (Vallega, 1992; Sharma *et al.* 1981; D'Egidio *et al.* 1993). Neben dem hohen Gehalt an wertvollen Inhaltsstoffen, die auch vermehrte Anteile an Lysin und Amylose umfassen (Lawrence *et al.* 1958; Mohammadkhani *et al.* 1998), besitzt *T. monococcum* genetische Variabilität für eine Reihe agronomisch wichtiger Merkmale. Diese umfassen die Lagerresistenz (Feldman und Sears, 1981; Vallega, 1992), Hitze- und Salztoleranz (Feldman und Sears, 1981; Gorham *et al.* 1991), Ertrag und Korngewicht sowie gute rheologische

Eigenschaften (Abdel-Aal *et al.* 1997; Borghi *et al.* 1996), die ihn als Kreuzungspartner interessant machen (Vallega, 1992; Castagna *et al.* 1995a;

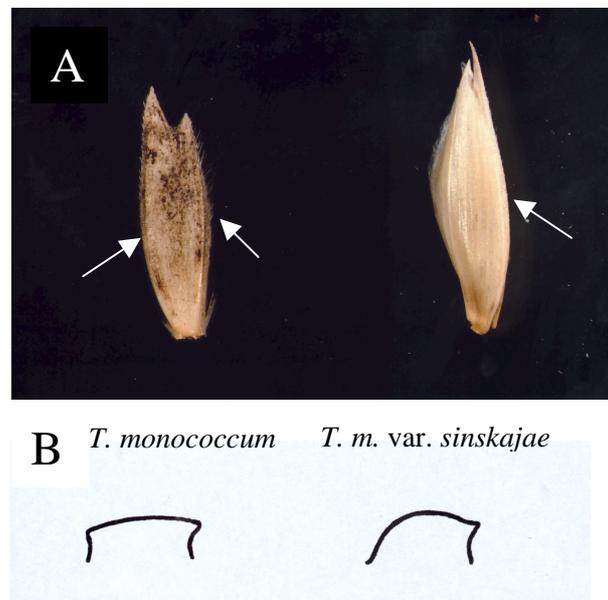


Abb.5: Äußere Hüllspelzen von *T. monococcum* und *T. m. var. sinskajae* in der Aufsicht (A) und als Zeichnung im Querschnitt (B). Die verstärkten Kiele der Spelzen sind mit Pfeilen markiert.

Abdel-Aal *et al.* 1997; D'Egidio *et al.* 1993). Außerdem besitzt *T. monococcum* eine Vielzahl von Resistenzen gegen Schädlinge und Herbizide (Feldman und Sears, 1981; Multani *et al.* 1989; Bai *et al.* 1998; Sánchez-Monge *et al.* 1996; Hussein *et al.* 1998; Ma *et al.* 1997).

Auch bei ernährungsbedingten Krankheiten könnte Einkorn von Nutzen sein. Zwar gibt es über das Verhalten von Einkornprolaminen bei Zöliaki, einer generellen Prolaminunverträglichkeit, bisher keine abgesicherten Ergebnisse, aber eine Untersuchung von Auricchio *et al.* (1982) weist auf eine Nichttoxizität der Einkorngliadine, eine Untergruppe der Prolamine, bei Zöliakierkrankung hin. Da diese Vermutungen bisher lediglich auf Untersuchungen an Rattenfeten basiert, müssen sie noch durch umfangreichere Studien abgesichert werden.

Mit diesen positiven genetischen Ressourcen ist Einkorn ein geeigneter Kandidat als Kreuzungspartner in der Weizenzüchtung oder um selber durch Züchtung gute Anbau- und Mehleigenschaften zu kombinieren. Da in Einkorn eine große Variabilität für die Backqualität existiert (Borghi *et al.* 1996; Corbellini *et al.* 1999; D'Egidio *et al.* 1993), ist im Hinblick auf einen züchterischen Erfolg durch markerunterstützte Selektion eine Identifizierung und Lokalisierung der genetischen Ursachen für die Backqualität, sowie eine Bestimmung gekoppelter Marker sinnvoll. Auch in der Züchtung von *T. aestivum* kann das Wissen um Anzahl und Lage der relevanten QTLs z.B. für eine gezielte Einkreuzung von *T. monococcum* oder eine unkomplizierte Bestimmung der Backqualität neuer Weizensorten von Vorteil sein.

Bevor jedoch durch eine genetische und quantitative Analyse die QTLs identifiziert werden können, muß die Backqualität einzelner Nachkommen einer gezielten Kreuzung bestimmt werden. Die dafür verwendeten Methoden werden im folgenden Kapitel dargestellt.

## 1.6 Bestimmung und Ursachen der Backqualität

Das Weizenmehl besteht hauptsächlich aus Stärke, die sich aus Amylose (unverzweigte  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 4-glykosidisch gebundene D-Glucose) und Amylopektin (verzweigte Amylose, Verzweigungen sind  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 6-glykosidisch gebunden) zusammensetzt. Die Proteine, mit einem Anteil von 11 bis 16%, bestehen aus Prolaminen und Glutelinen. Die Prolamine setzen sich aus den Gluteninen und Gliadinen zusammen und werden auch als Gluten-Proteine oder Kleber-Eiweiß bezeichnet. Der Anteil Fettsäuren ist bei Weizen mit ca. 2% sehr gering.

Zwar haben Stärke- und Fettsäurezusammensetzung einen Einfluß auf die Backqualität (Conforti *et al.* 1993; Soulaka und Morrison, 1985), aber der Haupteinfluß wird von der Qualität

der Proteine ausgeübt (Sontag-Strohm *et al.* 1996; Payne *et al.* 1987; Saponaro *et al.* 1995). Deshalb wird darauf im Folgenden näher eingegangen.

#### *Bestimmung der Backqualität*

Zur Bestimmung der Backqualität werden Teigproben auf ihre Zähigkeit und Dehnbarkeit getestet und geben damit Auskunft über die Prolaminstärke. Die Tests dafür werden mit einem Alveograph durchgeführt. Untersuchungen mit dem Farinograph klären u.a. über die Entwicklungszeit des Teiges und dessen Stabilität auf. Dafür werden Mehlproben unter konstanter Wasserzugabe gemischt. Der bei der Mischung gemessene Widerstand gibt Auskunft über die oben genannten Parameter.

Mit den Informationen, die durch diese beiden Methoden erhalten werden, wird dann ein Standardbackverfahren durchgeführt. Anhand der Brotvolumen und der Textur der Kruste lassen sich direkt Aussagen über die Backqualität der Mehlproben machen (Abb.6).

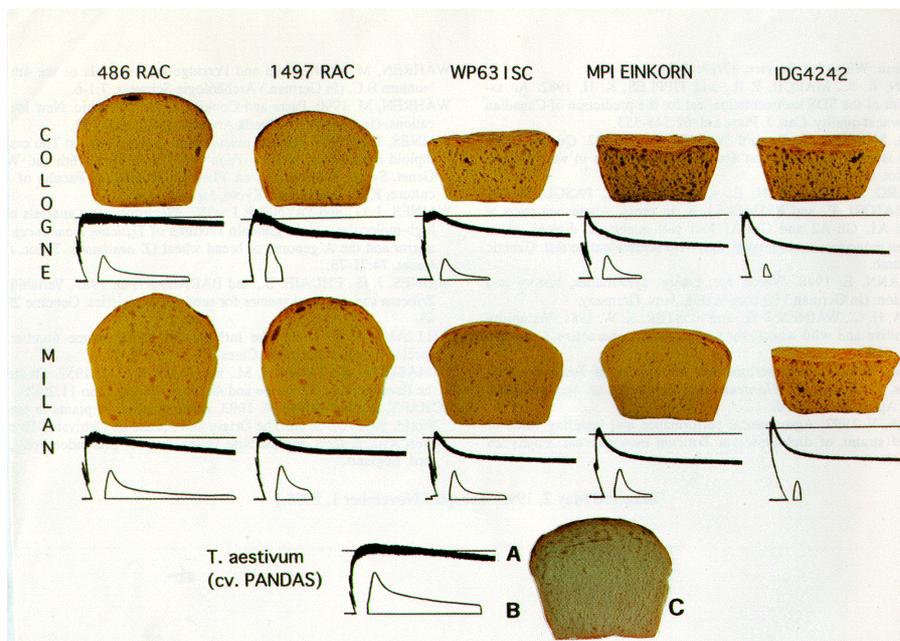


Abb.6: Farinogramme (A), Alveogramme (B) und Brote (C) einer Backqualitätsanalyse verschiedener Einkornlinien, angebaut in Köln (Reihe Oben) und S. Angelo (Reihe Mitte). Die Linien zeigen von links nach rechts abnehmende Backqualität. Das Brot in der unteren Reihe stammt von Mehl der Brotweizensorte Pandas.

Ein Schnelltest für die Backqualität ist der SDS-Sedimentationsvolumentest. In Untersuchungen von Preston *et al.* (1982), Borghi *et al.* (1996) und Corbellini *et al.* (1999) konnte eine Korrelation zwischen Brotvolumen und dem Sedimentationsvolumen von Mehlproben, die in SDS-haltiger Lösung geschüttelt wurden, festgestellt werden. Der Test gilt als Schnelltest für eine Vorhersage der Backqualität von Weizenmehlsorten. Umstritten ist bisher noch, ob die Proteinquantität der Mehlproben Einfluß auf das Sedimentationsvolumen hat und damit die Vorhersage der Backqualität verfälscht. Um das Problem zu umgehen, wird das Verhältnis von Sedimenta-

tionsvolumen zu Proteingehalt berechnet und so das Sedimentationsvolumen lediglich von der Qualität der Proteine und eventueller bisher noch nicht näher definierter, anderer Faktoren abhängig gemacht.

### *Ursachen*

Bisher glaubt man, daß die Hauptursachen für die variierende Backqualität in der Zusammensetzung der Prolamine liegt. Diese sind vor allem für die viskoelastische Struktur und die Mischstabilität des Teiges verantwortlich, die u.a. durch Interaktion der Prolamine miteinander und mit anderen Mehlbestandteilen verursacht wird (Sontag-Strohm *et al.* 1996; Payne *et al.* 1987; Saponaro *et al.* 1995). Die Prolamine definieren sich über ihre Löslichkeit in Alkohol (im Gegensatz zu den Glutelinen, die in Säuren oder Basen löslich sind) und werden in die Gliadine und die Glutenine unterteilt. Gliadine sind monomere Proteine, die durch interne Disulfidbrücken stabilisiert werden. Glutenine setzen sich aus mehreren gliadinähnlichen Monomeren zu Polymeren zusammen, die sich in die "High-Molecular-Weight-Glutenins" (HMW-GS) und die "Low-Molecular-Weight-Glutenins" (LMW-GS) unterteilen.

Die HMW-GS werden vom Locus Glu-1 auf dem langen Arm von Chromosom 1 codiert. Ihr Einfluß auf die Backqualität wurde in zahlreichen Untersuchungen determiniert. Meist konnte im Zusammenhang mit den Allelen der LMW-GS ein additiver Effekt auf die Backqualität festgestellt werden (Sontag-Strohm *et al.* 1996; Payne *et al.* 1987; Gupta *et al.* 1989).

Die LMW-GS werden vom Locus Glu-3 auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 codiert. Ihr Einfluß ist unumstritten und konnte in zahlreichen Untersuchungen bewiesen werden (Sontag-Strohm *et al.* 1996; Payne *et al.* 1987; Gupta *et al.* 1989, 1994; Saponaro *et al.* 1995; Corbellini *et al.* 1999). Dabei wird den LMW-GS im Vergleich mit den HMW-GS meist der größere Einfluß auf die Backqualität zugeschrieben (Gupta *et al.* 1989; Saponaro *et al.* 1995; Corbellini *et al.* 1999). Schwierig ist es den Einfluß der LMW-GS und der Gliadine, die von den Loci Gli-2 auf Chromosom 6 und dem eng mit Glu-3 gekoppelten Gli-1 codiert werden, zu unterscheiden.

Untersuchungen von Metakovsky *et al.* (1997) haben gezeigt, daß Glutenine teilweise auch von Gli-1 codiert werden. Die Vermutung, daß es sich bei den LMW-GS um leicht modifizierte Gliadine handelt, liegt daher nahe und wird zusätzlich durch Untersuchungen von Singh und Shepherd (1988a) gestützt, welche die beiden Loci Glu-3 und Gli-1 auf dem B-Genom von Weizen trennen und zeigen konnten, daß Glutenine wahrscheinlich durch Duplikation und Mutation aus den Gliadinen hervorgegangen sind.

Bisherige Untersuchungen haben gezeigt, daß die LMW-GS die Backqualität beeinflussen (Payne *et al.* 1987; Sontag-Strohm *et al.* 1996; Gupta *et al.* 1989; Saponaro *et al.* 1996; Corbellini *et al.* 1999; Sapirstein und Fu, 1998). Es konnte aber auch ein Einfluß von Gliadinallelen auf das Brotvolumen festgestellt werden (Hussain und Lukov, 1997; Huebner *et al.* 1997; Gupta *et al.* 1994).

Neben einer neuen Methode zur Analyse der Proteinzusammensetzung mit RP-HPLC (Nicolas *et al.* 1998), kann eine Lokalisierung und Identifizierung der für die Backqualität relevanten Gene zur weiteren Klärung beitragen.

### 1.7 Charakterisierung des Einkornweizens auf agronomische, rheologische, morphophysiologische und phylogenetische Merkmale

Der Einkornweizen wurde in den letzten Jahren im Hinblick auf seine genetische Variabilität und seine rheologischen und agronomisch-technischen Eigenschaften hin untersucht. Die dabei deutlich gewordenen Potentiale machen eine Züchtung mit dem Ziel der Verbesserung des Einkornweizens und einer Konzentration seiner positiven Eigenschaften sinnvoll.

Um eine umfassende Charakterisierung des Einkornweizens im Hinblick auf eine kommerzielle Nutzung zu ermöglichen, wurden 1393 Einkorn-Linien von internationalen Instituten gesammelt und auf ihre morphophysiologischen Eigenschaften, wie z.B. Blütezeitpunkt, Pflanzhöhe, Lagerresistenz, Anzahl Ährchen pro Ähre, Korngewicht etc. hin charakterisiert (Castagna *et al.* 1995b). Interessante Linien wurden zu einem Zuchtprogramm zur Verbesserung der Einkorneigenschaften zusammengeschlossen.

Das Ertragspotential dieser Linien wurde in Bezug auf Nitratbedarf und Saatkichte getestet, wobei kein Einfluß der Nitratmenge weder auf Ertrag noch auf Pflanzhöhe festgestellt werden konnte und damit die Aussicht auf die Entwicklung eines "low input"-Getreides besteht. Die Variabilität wichtiger agronomischer Merkmale läßt eine Anpassung an heutige Ackerbaumethoden mit Hilfe von Züchtungsprogrammen deutlich werden (Castagna *et al.* 1995a).

Untersuchungen von 25 Einkornlinien in Bezug auf Mehl- und Teigqualität von Borghi *et al.* (1996) ergaben trotz klebriger Teige bei 1/3 der Linien akzeptable Brotvolumina, die vergleichbar oder über den der Brotweizenstandards liegen. Das Mehl hat einen höheren Protein- und Carotingehalt als das des Brotweizens mit zufriedenstellender Teigstabilität.

Gute Backeigenschaften wurden auch von Corbellini *et al.* (1999) bei 25 Einkornlinien gefunden, die in Bezug auf ihre Keksbäckqualität hin untersucht wurden. Dabei konnte auch eine Korrelation guter Backeigenschaften mit den LMW-GS festgestellt werden, die sich besonders auf die Anwesenheit zweier Proteinbanden konzentrierte.

Neben den Untersuchungen zu den Mehleigenschaften und agronomischen Merkmalen von *T. monococcum* wurden Analysen zur Taxonomie durchgeführt, um Informationen über den genetischen Hintergrund und die Herkunft der verschiedenen Spezies zu erhalten. Dazu wurden 55 Einkorn-Linien, die neben *T. monococcum* auch *T. boeoticum*, *T. urartu*, *T. sinskajae*, *T. thaondar* und *T. aegilopoides* umfaßten mittels RFLP-Marker analysiert und auf ihren Verwandtschaftsgrad hin getestet. Dabei konnte die Eingruppierung in die Gruppen *T. m. monococcum*, *T. m. boeoticum* und *T. urartu* bestätigt werden, eine Untergruppenklassifizierung innerhalb der *T. monococcum*-Gruppe war jedoch schwierig und deutete auf eine nötige Revision der Einkorn-taxonomie basierend auf molekularen Markern hin (Castagna *et al.* 1994).

Eine phylogenetische Analyse des Einkornweizens erfolgte mit einer Auswahl von 388 Linien, deren Herkunft gleichmäßig über den Fruchtbaren Halbmond, einem Gebiet im Nahen Osten, das als Ursprungsort der Weizenzüchtung identifiziert werden konnte (Zohary und Hopf, 1966), verteilt liegen. Mittels AFLP-Analyse konnte eine kleine Gruppe wilder *T. m. boeoticum* ermittelt werden, welche die Vorläufer des kultivierten Einkornweizens *T. m. monococcum* sind und damit den Ursprungsort der Weizendomestikation in der Nähe des Karakadağ-Gebirges festlegen.

Die Isolation von 15 Mutanten, die von Castagna *et al.* (1993) durchgeführt wurde, diente dem Erwerb eines besseren Verständnisses der Pflanzenentwicklung und der Nutzung für eine varietätenabhängige Züchtung. Es konnte ein Entwicklungsmodell von *T. monococcum* präsentiert werden, das der Verbesserung der Spezies in Bezug auf Pflanzenmerkmale und Ährenfertilität dienen soll.

Die Entwicklung einer genetischen Karte von *T. monococcum* zur weiteren Aufklärung des genetischen Potentials dieses Getreides mit der anschließenden Identifizierung von Genen, die für den Ackerbau und die industrielle Nutzung wichtig sind, ist der nächste logische Schritt in diesem Projekt.

## 1.8 Thema der Arbeit

Der Einkornweizen bietet eine große genetische Variabilität für zahlreiche rheologische und agronomische Merkmale, die für die Pflanzenzüchter von großer Bedeutung sind. So ließe sich durch die Verwendung oder Einkreuzung von *T. monococcum* die benötigte Menge Fungizide und Insektizide, bedingt durch die in Einkorn vorhandenen Resistenzen, verringern, was im Hinblick auf die heutige Entwicklung einer umweltverträglichen, konventionellen Landwirtschaft wichtig ist. Die Möglichkeiten von *T. monococcum*, sich an extreme Bedingungen wie hohe Temperaturen und Salzkonzentrationen anzupassen, machen ihn zu einem Kandidaten für die moderne Züchtung, mit dem z.B. auch Probleme der Welternährung gelöst werden könnten.

Neben seinen positiven agronomischen und rheologischen Eigenschaften existieren auch eine Reihe von nachteiligen Merkmalen, die Einkorn hinter die Verwendung von Brotweizen zurückgedrängt haben. Seine meist geringe Lagerresistenz und der im Vergleich zum Brotweizen geringe Ertrag machen ihn für den Anbau unattraktiv, die bespelzten Körner eine maschinelle Ernte unmöglich.

Für diese Merkmale existiert aber in *T. monococcum* eine ausreichende genetische Variabilität, um die Probleme durch gezielte Züchtung überwinden zu können. Das ist jedoch nur interessant, wenn das später produzierte Mehl gute Backeigenschaften aufweist und der Teig gut zu verarbeiten ist.

Da in Einkorn auch für die Backqualität eine große Variabilität existiert, ist eine Analyse der Ursachen sinnvoll. Der bisher nachgewiesene Einfluß der Prolamine auf die Backqualität, soll in dieser Arbeit durch eine genetische Analyse differenziert. Mögliche andere relevante Loci sollen aufgedeckt und lokalisiert werden.

Dafür wurde eine DNA-Analyse zweier F<sub>2</sub>-Populationen von Einkorn mit RFLP- und AFLP-Markern durchgeführt. Die RFLP-Marker, deren Loci auf dem Weizengenom durch frühere Untersuchungen bekannt waren, dienten dabei als Anker, die AFLP-Marker konnten zur feineren Kartierung verwendet werden. Von den so erhaltenen molekularen Daten wurde eine integrierte Genkarte der beiden Populationen mit Hilfe des Programmes JoinMap berechnet und diese durch Intervallanalyse auf das quantitative Merkmal Backqualität hin untersucht.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Pflanzenmaterial

Die Experimente zur Erstellung einer Genkarte von *T. monococcum* und der Identifizierung der für die Backqualität relevanten QTLs auf dem A-Genom von *T. monococcum* basieren auf einer Population von 121 F<sub>2</sub>-Einzelpflanzen und einer Population von 168 F<sub>3</sub>-Familien, die aus der Kreuzung jeweils zweier reiner Linien hervorgegangen sind.

Die Kreuzung von Population 1 wurde im Hinblick auf eine Identifizierung der QTLs für die Backqualität durchgeführt. Es wurden die Linien ID 362 (schlechte Backqualität) und ID 1331 (gute Backqualität) verwendet deren Nachkommen im Folgenden als Backqualitätskreuzung bezeichnet werden. Die F<sub>1</sub>-Pflanzen wurden im Gewächshaus gezogen, geselbstet und die daraus resultierenden F<sub>2</sub>-Körner im Feld in Einzelkornablage ausgelegt. Im darauffolgenden Jahr wurden 168 Einzelpflanzen geerntet. Jeweils 3,7g des Ertrages jeder F<sub>2</sub>-Pflanze wurde in Parzellen von 0,98m<sup>2</sup> Größe ausgelegt. Bei einem mittleren Tausendkorngewicht von 43g lag die Saatkichte bei durchschnittlich 86 Körnern/m<sup>2</sup>. An zwei Standorten, Köln (Deutschland) und S. Angelo Lodigiano (Italien), wurden 168 Parzellen in zwei Wiederholungen angepflanzt, wobei die Reihenfolge der zweiten Wiederholung nach dem Zufallsprinzip verwürfelt wurde, um einen Nachbarschaftseffekt auszuschließen. Zusätzlich zu den 168 F<sub>3</sub>-Familien wurden Brotweizenstandards aus Deutschland und Italien ausgelegt. Sowohl die Backqualitätsanalyse als auch die Genotypisierung der 168 F<sub>2</sub>-Pflanzen erfolgte an den F<sub>3</sub>-Familien.

Die Kreuzung für Population 2, im Weiteren auch Kartierungskreuzung genannt, sollte der Erstellung einer Genkarte von *T. monococcum* mit dichter Markerabdeckung für eine sichere QTL-Identifizierung und der Kartierung des Merkmals "freidreschend" dienen. Dafür wurden zwei genetisch weit voneinander entfernte Linien (ID 49, *T. monococcum boeoticum*, Iraq und ID 69, *T. monococcum* var. *sinskajae*, Herkunft unbekannt), die auch in Bezug auf das Merkmal "freidreschend" polymorph sind, miteinander gekreuzt. Die F<sub>1</sub>-Körner wurden in Einzelkornablage ebenfalls im Gewächshaus ausgelegt, die F<sub>1</sub>-Pflanzen geselbstet und die daraus resultierenden 121 F<sub>2</sub>-Pflanzen für die Genotypisierung verwendet.

### 2.1.2 Genbibliotheken

Die CDO-Sonden (cDNA clones oat) sind hafergenomische Sonden die von M. Sorrells (Cornell Universität, New York) zur Verfügung gestellt wurden. Die weizengenomischen WG-Sonden stammen von S. Tanksley und M. Sorrells ebenfalls von der Cornell Universität. Außerdem wurden weizengenomische PSR-Sonden (M. Gale, John Innes Center, Norwich, UK) und Sonden für die beiden Protein-Loci Glu-1 (Thompson *et al.* 1983) und Gli-1 (Bartels *et al.* 1986) zur DNA-Analyse verwendet.

### 2.1.3 Chemikalien, Enzyme und Antibiotika

Die für diese Arbeit genutzten Chemikalien stammen von den Firmen Biomol (Hamburg), Bio-Rad (München), Boehringer (Mannheim), Merck (Darmstadt), Pharmacia (Uppsala, Schweden), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (München), Radionukleotide, Nylonmembranen und Röntgenfilme von Amersham Buchler (Braunschweig). Die Enzyme waren von den Firmen Boehringer (Mannheim), Gibco-BRL (Neu Isenburg), MBI-Fermentas (Leon-Rot), Pharmacia (Uppsala, Schweden) und Stratagene (Heidelberg), Adapter und Primer von MWG (Eberswalde).

### 2.1.4 Lösungen und Medien

Beschreibungen zur Herstellung der Lösungen Denhardt's Reagenz, Ladungspuffer für Agarose- und Polyacrylamidgele, LB-Medium, Phosphatpuffer, SSC, TAE, TBE und TE sind in Sambrook *et al.* (1989) zu finden.

Der Ladungspuffer für die saure Polyacrylamid-Gelelektrophorese (A-PAGE) besteht aus 30% Glycerol, 6M Harnstoff, 25mM Essigsäure und 25% Pyronin G.

Der Hybridisierungspuffer bei der RFLP-Analyse setzt sich aus 5xSSC, 50mM Phosphatpuffer, 0,4% SDS, 5x Denhardt's Reagenz, 2,5mM EDTA und 5% Dextransulfat zusammen.

Die für die Herstellung kompetenter Zellen benötigten Lösungen TFB I und TFB II setzen sich folgendermaßen zusammen: TFB I: 30mM Kalium-Acetat, 50mM Manganchlorid, 100mM Kaliumchlorid, 10mM Calciumchlorid und 15% Glycerol TFB II: 10mM MOPS, 75mM Calciumchlorid, 10mM Kaliumchlorid und 15% Glycerol.

## 2.2 Methoden

Zur Identifizierung und Lokalisierung der backqualitätsrelevanten QTLs auf dem Einkorn-genom wurden zunächst Genkarten von den sieben Chromosomen aus RFLP- und AFLP-Markern mit Hilfe des statistischen Computerprogrammes JoinMap erstellt. Anschließend wurde das phenotypische Merkmal Backqualität in Form des SDS-Sedimentationsvolumen-testes und der Proteingehaltsbestimmung analysiert. Auf den berechneten Genkarten konnten dann durch Intervallkartierungsanalyse mit MAPMAKER/ QTL die relevanten QTLs detektiert werden.

Der Einfluß von "High Molecular Weight"- und "Low Molecular Weight"-Gluteninen auf die Backqualität von Einkornweizen wurde nach Analyse und Kartierung der entsprechenden Loci überprüft. Das morphologische Merkmal "freidreschend" wurde durch mechanische Methoden determiniert und auf den Genkarten lokalisiert.

### 2.2.1 Genotypisierung

Für die Genotypisierung der Qualitätspopulation wurden F<sub>3</sub>-Pflanzen im Feld angebaut. Von jeder F<sub>3</sub>-Familie wurden von mindestens 30 F<sub>3</sub>-Pflanzen Blätter geerntet, gefriergetrocknet und gemahlen. Das daraus resultierende Blattmaterial jeder F<sub>3</sub>-Familie wurde vereinigt, gemischt und für die DNA-Isolation verwendet.

Für die genotypische Analyse der Kartierungspopulation wurde das Blattmaterial aus vier bis sechs Wochen alten Gewächshauspflanzen gewonnen. Die Blätter wurden für die DNA-Isolation entweder gefriergetrocknet und gemahlen, oder unter flüssigem Stickstoff zermörsert.

#### 2.2.1.1 DNA-Isolation

Die DNA-Isolation erfolgte nach einem Protokoll von QIAGEN (Hilden, Deutschland) für genomische DNA aus Blättern höherer Pflanzen. Für die Isolation wurden entweder 4g frisches Blattmaterial, oder 0,4g gefriergetrocknetes Material +3,6ml steriles H<sub>2</sub>O verwendet. Die DNA wurde mit CTAB-haltigem Extraktionspuffer extrahiert, mit Chloroform/Isoamylalkohol ausgeschüttelt und unter Niedrigsalz- und passenden pH-Bedingungen an das aniontauscheidende Harz einer voräquilibrierten QIAGEN-100-Säule gebunden. Kontaminationen wurden unter mittleren

Salzkonzentrationen ausgewaschen und die DNA anschließend unter Hochsalzkonzentrationen eluiert, mit Isopropanol gefällt und in 0,1xTE gelöst.

#### 2.2.1.2 AFLP-Analyse

Die AFLP ("Amplified-Fragment-Length-Polymorphism")-Analyse ist eine PCR-basierende Methode, bei der DNA-Fragmente selektiv radioaktiv markiert werden und ihr Längenpolymorphismus nach Auftrennung über einem Polyacrylamidgel auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht wird. Die AFLP-Analyse wurde basierend auf dem Originalprotokoll von Vos *et al.* (1995) durchgeführt.

Die Restriktion der DNA erfolgte mit den Restriktionsendonukleasen MseI und EcoRI. An die Enzymschnittstellen wurden die Adapter MseI 92A18/ 92A19 und EcoRI 91M35/ 91M36 ligiert und die Fragmente mit den selektiven Primern E01, M01 oder E01, M02 präamplifiziert. Die anschließende Amplifizierung erfolgte mit EcoRI+3- und MseI+3-Primern. Die Sequenzen der Adapter und der für die Prä- und Amplifizierung genutzten Primer sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Die Gelanalyse erfolgte durch ein 4,5%iges denaturierendes Sequenzgel. Die amplifizierten Proben wurden mit 2 Volumen Polyacrylamidgel-Ladungspuffer versetzt, denaturiert und bei 58 Watt für 1,5 Stunden aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde 0,5x TBE verwendet. Zum Größenvergleich der Fragmentbanden auf den verschiedenen Gelen, wurde eine 1kb-Leiter (GibcoBRL) dephosphoryliert, mit  $^{33}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP endmarkiert und auf jedem Gel mit aufgetrennt. Das fixierte Gel wurde anschließend mit einem Hyperfilm<sup>TM</sup> MP für ein bis drei Tage exponiert.

Die Nomenklatur der erhaltenen Fragmentbanden erfolgte nach folgendem Schema: Der für die Amplifizierung der Fragmente genutzte EcoRI-Primer wird mit Buchstabenkürzel E und Nummer voran gestellt, danach folgt die Nummer des MseI-Primers und zuletzt die Nummer der mit dieser Primerkombination erzeugten, polymorphen Bande. Konnte mit Hilfe des Größenstandards auf beiden Populationen eine Bande gleicher Größe identifiziert werden, erhielt diese Bande anstelle der laufenden Nummer den Buchstaben a, u.s.w. (siehe Abb.7, Seite 37)

Tab 1: Adapter- und Primersequenzen für die AFLP-Analyse. Die Sequenzen sind 5'→3' aufgeführt

Adapter	MseI 92A18	GACGATGAGTCCTGAG
	MseI 92A19	TACTCAGGACTCAT
	EcoRI 91M35	CTCGTAGACTGCGTACC
	EcoRI 91M35	AATTGGTACGCAGTC
Primer mit einer selektiven Base	E01	GAC TGC GTA CCA ATT CA
	M01	GAT GAG TCC TGA GTA AA
	M02	GAT GAG TCC TGA GTA AC
EcoRI-Primer mit 3 selektiven Basen mit E01 präamplifiziert	E32	GAC TGC GTA CCA ATT CAAC
	E33	GAC TGC GTA CCA ATT CAAG
	E35	GAC TGC GTA CCA ATT CACA
	E36	GAC TGC GTA CCA ATT CACC
	E37	GAC TGC GTA CCA ATT CACG
	E38	GAC TGC GTA CCA ATT CACT
	E40	GAC TGC GTA CCA ATT CAGC
	E41	GAC TGC GTA CCA ATT CAGG
	E42	GAC TGC GTA CCA ATT CAGT
MseI-Primer mit 3 selektiven Basen mit M01 präamplifiziert	M32	GAT GAG TCC TGA GTA AAAC
	M33	GAT GAG TCC TGA GTA AAAG
	M36	GAT GAG TCC TGA GTA AACC
	M38	GAT GAG TCC TGA GTA AACT
	M40	GAT GAG TCC TGA GTA AAGC
MseI-Primer mit 3 selektiven Basen mit M02 präamplifiziert	M48	GAT GAG TCC TGA GTA ACAC
	M59	GAT GAG TCC TGA GTA ACTA
	M60	GAT GAG TCC TGA GTA ACTC
	M61	GAT GAG TCC TGA GTA ACTG
	M62	GAT GAG TCC TGA GTA ACTT

### 2.2.1.3 RFLP-Analyse

Bei der RFLP (Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus)-Analyse werden Unterschiede in der Fragmentlänge restringierter, genomischer DNA sichtbar gemacht. Das geschieht durch

Hybridisierung radioaktiv markierter, kurzer DNA-Fragmente (Sonden) mit korrespondierenden Sequenzen der genomischen DNA. Liegt diese Sequenz auf einem DNA-Bereich, der nach dem Verdau mit einem Restriktionsenzym durch Insertion oder Deletion von DNA-Blocks oder durch Verschiebung, Wegfall oder Neubildung einer Restriktionsschnittstelle eine andere Länge hat als die Vergleichs-DNA, kommt es zu einem polymorphen Signal durch die markierte Sonde (siehe Abb.8, Seite 44).

#### *Vorbereitung der Sonden*

Plasmid-DNA der verschiedenen Sonden wurden zur Vermehrung und Isolation in kompetente Zellen des *E. Coli* Stamms TG2 (Gibson, 1984) transformiert. Die Herstellung des Stamms und die Transformation kompetenter Zellen erfolgte nach dem Protokoll von Hanahan (1983).

Für die Herstellung der kompetenten Zellen wurde eine Einzelkolonie des Stamms TG2 in 100ml LB-Medium vermehrt und die Zellen sedimentiert. Das Pellet wurde in TFB I gespült, erneut zentrifugiert und in TFB II aufgenommen. Die Bakterien/Puffer-Suspension wurde aliquotiert, schockgefroren und konnte so für die Transformation verwendet werden.

Pro Transformationsansatz wurde ein Aliquot kompetenter Zellen mit Plasmid-DNA versetzt, einem Hitzeschock unterzogen und zur selektiven Vermehrung auf ampicillinhaltigen Agarplatten ausgestrichen. Mit den angewachsenen Einzelkolonien wurden 2ml LB-Medium versetzt und nach der Vermehrung der Bakterien die Plasmid-DNA mit dem Plasmidaufreinigungskit der Firma QIAGEN (1996) isoliert. Die Plasmide wurden anschließend mit den Restriktionsenzymen entsprechend Tabelle 2 geschnitten, über ein 1%iges Agarose-Gel aufgetrennt und die Sonde mit QIAEXII (QIAGEN, 1996) aus dem Gel eluiert.

#### *Sondenmarkierung und -aufreinigung*

Die radioaktive Markierung der Sonden erfolgte nach Feinberg und Vogelstein (1983). Nach Anlagerung von Hexadeoxyribonukleotiden mit zufälliger Sequenz als Primer an das denaturierte DNA-Fragment wurde dieses durch das Klenow-Fragment der Polymerase und freie Deoxyribonukleotide polymerisiert. Die Markierung erfolgte dabei durch radioaktives  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP. Im Anschluß an die Markierung wurden die radioaktiv markierten Sonden von Proteinen und freien Nukleotiden über die QIAquick™ Zentrifugationssäulen nach Herstelleranweisung (QIAGEN, 1996) gereinigt.

#### *Verdau und Vorbereitung der Proben*

Für die RFLP-Analyse wurden von jedem Nachkommen 10µg genomischer DNA mit 100U von EcoRI, EcoRV oder XbaI mit dem entsprechenden Volumen 10xRestriktions-puffer für 12 bis

Tab.2: Liste der verwendeten RFLP-Sonden. Die inserierten Fragmente wurden mit den der Vektorrestriktionsstelle entsprechenden Enzymen ausgeschnitten und isoliert. Die Sonden wurden nur verwendet, wenn ihre Fragmentgröße den Angaben entsprachen.

Sonde	Vektor	Vektor-restriktionsstelle	Insertgröße [kb]
CDO412	BS-SK-	EcoRI/ XhoI	1,3
CDO540	pUC8	PstI	2,0
PSR102	pUC18	HindIII/ EcoRI	0,57
PSR113	pUC18	HindIII/ EcoRI	0,5
PSR128	pUC18	HindIII/ EcoRI	0,56
PSR164	pUC18	HindIII/ EcoRI	0,4
PSR601	pUC8	PstI	2,8
PSR604	pUC8	PstI	1,5
PSR627	pUC8	PstI	2,6
PSR637	pUC8	PstI	1,8
PSR910	Pubs3	PstI	1,0
PSR931	Pubs3	PstI	1,3
PSR934	Pubs3	EagI	1,8
PSR1051	pUC18	PstI/ XbaI	0,3
PSR1316	Pubs1	EcoRI/ XhoI	0,4
WG114	pGem4	PstI	1,4
WG178	pGem4	PstI	1
WG223	pGem4	PstI	1,6
WG282	pGem4	PstI	1,7
WG364	pGem4	PstI	1,9
WG380	pGem4	PstI	1,6
WG420	pGem4	PstI	1
WG464	pGem4	PstI	1,4
WG644	pGem4	PstI	0,7
WG983	pGem4	PstI	0,8
WG996	pGem4	PstI	1
WG1026	pGem4	PstI	1,2

16 Stunden bei 37°C geschnitten. Die Enzyme wurden aufgrund ihrer hohen Polymorphismenraten in bisherigen Untersuchungen an Gerste (Heun *et al.* 1991) und Weizen (Chao *et al.* 1989) ausgewählt. Nach der Restriktion wurde den Proben 1/10 Volumen Na-Acetat und zwei Volumen kaltes 100%iges Ethanol zugegeben und die DNA bei -70°C für 15 Minuten gefällt. Die gefällte DNA wurde pelletiert, das Pellet gewaschen und in 30µl Agarosegel-Ladungspuffer gelöst.

#### *Southern-Analyse*

Die Southern-Analyse wurde nach einem modifizierten Protokoll von Southern (1975) durchgeführt. Die restringierten Proben wurden durch ein 1%iges, 20cm langes Agarosegel aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgte bei 30-45V für 12 bis 16 Stunden. Als Laufpuffer und zur Herstellung des Agarosegels wurde 1xTAE verwendet. Die DNA wurde nach der Auftrennung *in situ* denaturiert und durch einen alkalischen Kapillarblot auf eine positiv geladene Hybond-N+ Nylonmembran übertragen.

### *Prähybridisierung, Hybridisierung und Waschen*

Um eine unspezifische Bindung der Sonde mit der genomischen DNA und damit ein starkes Hintergrundsignal zu verhindern, wurde die Membran mit fragmentierter und denaturierter Heringssperma-DNA bei 65°C für drei bis sechs Stunden vorhybridisiert. Die anschließende Hybridisierung zwischen radioaktiv markierter, denaturierter Sonde und Membran fand über Nacht, ebenfalls bei 65°C statt. Sowohl für die Prä-, als auch für die Hybridisierung, wurden 50ml Hybridisierungspuffer verwendet. Die Membran wurde gemäß Heun *et al.* (1991) gewaschen und anschließend auf einem GP SO-230 Phosphorfilm (Kodak, Rochester, New York) je nach Signalstärke für ein bis drei Tage exponiert.

### *Analyse mit dem Phosphorimager*

Das auf dem Film gespeicherte Signal wurde mit dem Phosphorimager Storm 860 (Molecular Dynamics, Sunnyvale, USA) und der Software ImageQuant (Molecular Dynamics) analysiert.

Der Phosphorimager ist ein optischer Scanner, der digitale Bilder von markierten Sonden produziert. Die Imagerfolie ist mit einem Belag aus BaFBr:Eu<sup>2+</sup>-Kristallen in einer organischen Matrix beschichtet. Die Übernahme radioaktiver Strahlung regt Elektronen in den Europium-Ionen an, so daß die Reduktion von BaFBr zu BaFBr<sup>-</sup> erfolgt.

Durch die Bestrahlung mit rotem Licht der Wellenlänge 635nm emittiert der angeregte Komplex blaues Licht, das von dem optischen System gesammelt, durch einen optischen Filter von gestreutem Anregungslicht befreit und durch die Photomultierröhre in elektrischen Strom umgewandelt wird. Der elektrische Strom kann dann von einem analogen in ein digitales Signal verwandelt und als Bild sichtbar gemacht werden (siehe Abb.8, Seite 44).

## 2.2.2 Genkarten-Kalkulation

Die statistische Auswertung der molekularen Daten erfolgte mit dem Programm JoinMap (Stam und van Ooijen, 1995; Stam 1993). Dieses Programm ist ein statistisches Computerprogramm, das aus der Rekombinationshäufigkeit zwischen den einzelnen Markern eine Reihenfolge der Marker und deren Abstände berechnet. Es bietet außerdem die Möglichkeit, Ergebnisse aus verschiedenen Kartierungsexperimenten zusammenzufügen und eine gemeinsame Karte zu berechnen. Es besteht aus mehreren Modulen, welche die verschiedenen Aufgaben in einem Kartierungsprojekt erfüllen. Für die Konstruktion der Genkarten der sieben Einkornchromosomen wurden Kopplungsgruppen berechnet, welche die Chromosomen representieren. Im

Folgendes wird darum der Begriff Chromosom synonym für den der Kopplungsgruppe verwendet.

Zunächst wurden die molekularen Daten einer Analyse ihrer Segregationsrate unterzogen. Dabei wurde mit Hilfe des  $\chi^2$ -Testes überprüft, ob die Daten eine signifikante 3:1- bzw. 1:2:1-Spaltung zeigen, oder ob die Segregation gestört ist und die Daten damit nicht als signifikant angesehen werden können.

Für die Konstruktion einer integrierten Karte, basierend auf den molekularen Daten der Populationen 1 und 2, wurden dann separate Zweipunktanalysen durchgeführt. Dabei wurden die Rekombinationshäufigkeiten zwischen paarweisen Markern berechnet. Anschließend wurden die Daten beider Populationen in einem Datensatz vereinigt.

Von den paarweisen, vereinigten Daten wurden die LOD-Werte (Likelihood of the Odds), d.h. der Logarithmus des Quotienten aus der Wahrscheinlichkeit für den Zusammenhang der Marker und der Wahrscheinlichkeit für ihre Unabhängigkeit berechnet und die Marker anhand der Ergebnisse in Kopplungsgruppen zusammengefügt. Der Schwellenwert für die Annahme einer Kopplung zwischen zwei Markern war  $\text{LOD} \geq 3,0$ .

Bevor die Markerreihenfolge berechnet wurde, erfolgte eine Dreipunktanalyse, bei der die LOD-Werte der drei möglichen Ordnungen innerhalb des Triplets bestimmt wurden. Überstieg der LOD-Wert der einen Ordnung den der anderen beiden um einen anwenderbestimmten Schwellenwert ("triplet-value"), wurde diese Ordnung bei allen weiteren Berechnungen als fixiert betrachtet. Wird der Triplet-Wert zu niedrig festgelegt, kommt es zur Bildung einer zu großen Menge fixierter Markeranordnungen, die nicht wirklich sicher sind. Um das zu vermeiden, wurde der Schwellenwert hier bei 6,0 festgelegt.

Die Festlegung der Markerreihenfolge ging von einem Markerpaar aus, dessen Abstand anhand der Rekombinationsrate bestimmt wurde. Der als nächstes zu addierende Marker wurde auf Basis eines Vergleichs der LOD-Werte der noch nicht addierten Marker mit denen der schon platzierten Marker ausgewählt und an seiner wahrscheinlichsten Stelle in der Karte platziert, ohne die ursprüngliche Reihenfolge zu ändern. Danach wurde die Wahrscheinlichkeit der neuen Karte berechnet. Verursachte der neu platzierte Marker einen Wahrscheinlichkeitsverlust, der einen anwenderdefinierten Schwellenwert ("jump-threshold") überstieg, wurde der Marker nicht addiert, sondern zu einem späteren Zeitpunkt noch einmal getestet. Der "jump threshold" wurde mit 5,0 festgelegt.

Nach einer ebenfalls anwenderdefinierten Anzahl addierter Marker ("ripple value") führte JoinMap erneut eine Dreipunktanalyse der Markerreihenfolge durch, die der Absicherung und Verbesserung der Karte diene. Dabei bewegte sich vom Anfang der Karte ein "Fenster" von drei hintereinander liegenden Markern bis zu ihrem Ende, in dem die wahrscheinlichste Reihenfolge dieser drei Marker berechnet wurde. Diese Analyse wurde nach der Addition fünf neuer Marker durchgeführt und damit die Kartenkonstruktion abgeschlossen.

Marker, die auf diese Weise keinem eindeutigen Locus auf der Genkarte zugeordnet werden konnten, wurden durch eine erneute Berechnung der Markerpositionen unter Nichtbeachtung des Jump-Wertes Regionen auf den Karten zugeordnet, die als Untergruppen bezeichnet werden. Diese Marker werden auf der Genkarte nicht angegeben, können aber zusätzliche Informationen bei der Lokalisierung von Genen bieten.

### 2.2.3 Bestimmung der Backqualität

Zur Bestimmung des Merkmals Backqualität wurden die SDS-Sedimentationsvolumina und Proteingehalte des Mehls der Nachkommen der Qualitätskreuzung bestimmt. Eine positive Korrelation zwischen Brotvolumen und dem SDS-Sedimentationstest konnte u.a. von Borghi *et al.* (1996) und Preston *et al.* (1982) festgestellt werden. Für eine vom Proteingehalt unabhängigen Kalkulation der Backqualität wird das SDS-Sedimentationsvolumen durch den Proteingehalt dividiert. Der so berechnete Quotient ist ein Maß für die Backqualität von Weizenmehl und wird im folgenden mit BQ bezeichnet.

#### 2.2.3.1 SDS-Sedimentationstest

Der SDS-Sedimentationstest erfolgte nach Preston *et al.* (1982), modifiziert. Dafür wurden Mehlproben von 500mg in graduierten Röhrchen mit 5ml H<sub>2</sub>O dest in 2minütigem Abstand geschüttelt. Nach vier Minuten wurden 5ml einer Lösung aus 2% SDS und 11% Milchsäure zugegeben und weiterhin alle zwei Minuten geschüttelt. Nach zehn Minuten wurden die Röhrchen in eine senkrechte Position gebracht und die Höhe des Sedimentes nach weiteren 15 Minuten abgelesen.

### 2.2.3.2 Bestimmung des Proteingehaltes

Die Bestimmung des Proteingehaltes des Einkornmehls wurde nach der Kjeldahl-Methode (AACC Methode 46-11A) durchgeführt. Dabei wird das gesamte organische Material von 1g Mehl oxidiert. Es entsteht u.a. Ammoniumsulfat, das mit alkalischen Lösungen zu  $\text{NH}_3$  umgewandelt wird. Der Ammoniak wird abdestilliert und mit Hilfe eines Titrationsverfahrens quantifiziert.

### 2.2.4 QTL-Analyse

Für die Identifizierung der für die Backqualität relevanten QTLs wurde das Computerprogramm MAPMAKER/QTL, ein Intervallkartierungsprogramm, das auf einem Ein-QTL-Modell beruht, genutzt. Dieses Programm kann nur mit molekularen Daten aus einem Kartierungsexperiment rechnen. Da die von JoinMap festgelegte Markerreihenfolge Marker aus beiden Populationen enthielt, mußte die berechnete Karte für MAPMAKER/QTL nutzbar gemacht werden. Dafür wurden die unbearbeiteten Kartierungsdaten der Qualitätspopulation von MAPMAKER/Exp. 3.0 geladen. Für jedes von JoinMap berechnete Chromosom wurden die Marker der Qualitätspopulation in der von JoinMap festgelegten Reihenfolge eingegeben. Von diesen Sequenzen wurden die Abstände der Marker mit MAPMAKER/Exp. 3.0 auf Basis einer Mehrpunktanalyse berechnet.

Die so entstandenen Karten werden im Folgenden als Markerrahmen bezeichnet. Sie bilden die Basis für die Identifizierung und Analyse der QTLs für die Backqualität. Die Markerrahmen werden von MAPMAKER/QTL geladen und mögliche QTLs in Form des LOD-Wertes entlang des Genoms in 1cM-Schritten berechnet. Bei einem LOD-Wert über 3,0 wurde das Vorkommen eines QTLs als wahrscheinlich angenommen. Die Wahl des Schwellenwertes orientierte sich an der empirischen Kalkulation von Lander und Botstein (1989), die anhand von Genomgröße und durchschnittlichem Markerabstand eine Chance für das Vorkommen falscher Positiver auf unter 5% bei einem LOD von 3,0 festlegen konnte. Der hier trotz höherer Markerdichte gewählte LOD-Wert von 3,0 gewährleistet eine sichere Detektion der QTLs und eine Reduktion falscher Positiver unter die 5%-Rate. Ein Nachteil dieses sehr hohen LOD-Wertes ist jedoch, daß QTLs mit kleinerem Einfluß, die sich nur mit geringer Wahrscheinlichkeit detektieren lassen, so nicht lokalisiert werden.

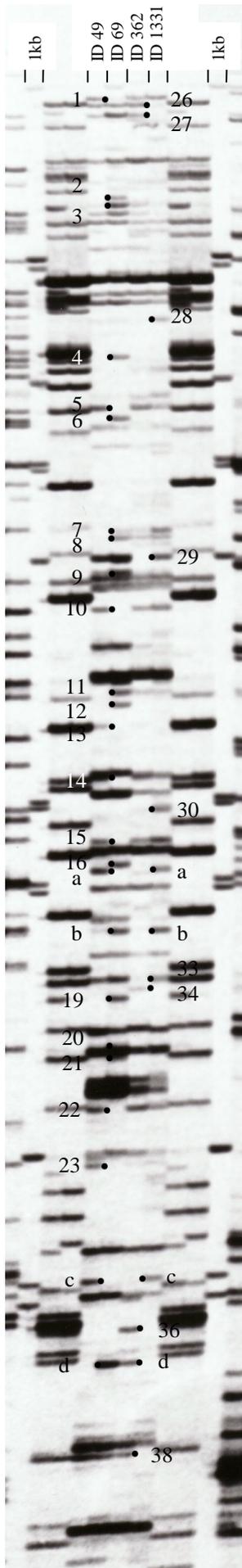
### 2.2.5 Analyse der Glutenine

Um einen Einfluß der Gluteninallele auf die Backqualität überprüfen zu können, wurden die Glutenine analysiert, auf den berechneten Genkarten lokalisiert und deren Locus mit den QTL-Positionen verglichen.

Die Analyse der Glutenine erfolgte nach dem Protokoll von Singh *et al.* (1991) mit kleinen Modifikationen. Dabei wurden zunächst aus zerkleinerten Körnern die Gliadine mit Isopropanol extrahiert und verworfen. Aus dem verbleibenden Rest wurden die Glutenine extrahiert, mit DTT reduziert, anschließend mit Vinylpyridin alkyliert und gefällt. Das durch Zentrifugation erhaltene Pellet wurde für eine saure Polyacrylamid-Gelelektrophorese (A-PAGE) in dem unter 2.1.4 beschriebenen Ladungspuffer gelöst. Die Auftrennung der Glutenine erfolgte bei 18°C und 500V über ein 12,5%iges Polyacrylamid-Gel. Der Laufpuffer in der oberen Pufferkammer bestand aus 0,15%iger, der der unteren Pufferkammer aus 20%iger Essigsäure. Die Trenndauer war variabel. Die Proteinbanden, welche die verschiedenen Gluteninallele darstellen, wurden JoinMap wie die molekularen Daten zugänglich gemacht und ihre Position auf der Genkarte berechnet.

### 2.2.6 Analyse des Merkmals "freidreschend"

Das Merkmal "freidreschend" bezeichnet die Eigenschaft der Nichtverwachsung von Korn und äußerer weicher Hüllspelze, die das Korn beim Dreschen freigibt. Die weiche Hüllspelze ist nur einfach gekielt, im Gegensatz zu den Hüllspelzen der nicht-freidreschenden Linien (z.B. *T. m. monococcum*, oder *T. m. boeoticum*) deren Hüllspelze doppelt gekielt ist (Abb.5) Das Merkmal wurde an den 127 Nachkommen der Kartierungskreuzung untersucht. Dabei wurden von jedem Nachkommen eine Ähre per Hand auf Verwachsung und Härte der Hüllspelze hin getestet, die Daten für "freidreschend" in einen für JoinMap lesbaren Zustand gebracht und das Merkmal auf den Genkarten kartiert.



### 3. Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war die Analyse und Identifizierung der für die Backqualität von Weizen relevanten QTLs. Für die Lokalisierung der QTLs für die Backqualität auf dem Einkorn genom wurde zunächst eine Genotypisierung der F<sub>2</sub>-Populationen 1 und 2 mit RFLP- und AFLP-Markern durchgeführt, die der Konstruktion einer Genkarte dienten. Anschließend wurde das phenotypische Merkmal Backqualität der Kreuzungsnachkommen der Qualitätspopulation mittels SDS-Sedimentationsvolumentest und des Proteingehalts bestimmt. Auf der erstellten Genkarte wurden dann durch statistische Methoden die QTLs lokalisiert.

Um einen Einfluß der Glutenine auf das Merkmal Backqualität zu untersuchen, wurde die allelische Zusammensetzung der Glutenine analysiert, die Allele auf der Genkarte kartiert und eine Korrelation mit den identifizierten QTLs überprüft. Im Hinblick auf eine zukünftige kommerzielle Nutzung des Einkornweizens wurde zusätzlich das morphologische Merkmal "freidreschend" auf der Genkarte lokalisiert.

#### 3.1 Genotypisierung der Populationen 1 und 2 mit AFLP und RFLP-Markern

Für die Erstellung einer Genkarte wurden die F<sub>2</sub>-Populationen 1 und 2 mit AFLP- und RFLP-Markern analysiert. Die AFLP-Marker dienen der dichten Abdeckung des Genoms, die RFLP-Marker als Anker um die AFLP-Marker den sieben Einkornchromosomen zuordnen zu können.

Abb.7: Abbildung der AFLP-Primerkombination E4132 von den Eltern der Kartierungs- und der Backqualitätspopulation (ID69/ID49 und ID362/ ID1331). Flankierend ist der 1kb-Marker aufgetragen. Das Prinzip der Bandennummerierung ist in Material und Methoden, Punkt 2.2.1.2 erklärt. Die fortlaufende Nummerierung der AFLP-Banden beginnt mit der ersten polymorphen Bande der Kartierungspopulation und endet mit der letzten. Sie setzt sich bei der ersten polymorphen Bande der Qualitätspopulation fort. Die für beide Populationen identischen Banden erhalten anstelle einer Nummer einen Buchstaben, der für beide Populationen gleich ist.

### AFLP-Analyse

Die Analyse der Qualitätspopulation mit AFLP-Markern wurde mit jeweils neun verschiedenen E-, bzw. M-Primern vorgenommen, die in 29 Kombinationen angewendet wurden. Die 29 Kombinationen ergaben 294 lesbare, polymorphe Banden. Die Kartierungspopulation wurde mit jeweils fünf unterschiedlichen E- und M-Primern analysiert, die mit 18 Primer-Kombinationen zu 196 lesbaren Banden geführt haben (Tab.3). Sechzehn Primer-Kombinationen wurden auf beide Populationen angewendet. Mit Hilfe einer 1kb-Leiter und basierend auf Musterähnlichkeiten sich wiederholender Banden konnten 27 Fragmente identifiziert werden, die in beiden Populationen identisch waren und so eine spätere Integration der Genkarten ermöglichen. Beispielhaft für alle AFLP-Marker ist die Primer-Kombination E4132 von den Eltern ID 49 und ID 69 der Kartierungskreuzung, als auch der Eltern ID 362 und ID 1331 der Backqualitätskreuzung in Abbildung 7 dargestellt.

Tab.3: Liste der AFLP-Marker, die für die Genotypisierung der Populationen 1 und 2 verwendet wurden. Die Nomenklatur AFLP-Marker erfolgte nach dem in Punkt 2.2.1.2, Material und Methoden beschriebenen Prinzip (siehe auch Abb.7). Der Name eines AFLP-Markers setzt sich aus der verwendeten Primer-Kombination und einer fortlaufenden Numerierung der polymorphen Banden zusammen. In beiden Populationen identische Banden erhalten anstelle der laufenden Nummer einen Buchstaben. In der Tabelle ist angegeben, für welche Population der Marker angewendet wurde und ob sich der Marker auf einem präzisen Locus kartieren ließ (1) oder ob er lediglich mit einer Kopplungsgruppe der sieben Einkornchromosomen koppelte (2). Die entsprechende Nummer der Kopplungsgruppe ist unter (3) angegeben. Bei Nichtbeachtung des Jump-Wertes konnten die meisten unkartierten AFLP-Marker einer Region auf den Genkarten zugeordnet werden, die als Untergruppe bezeichnet werden (siehe auch Abb.9 und Punkt 2.2.4, Material und Methoden). Die Nummer der Untergruppe in der sich der Marker befindet ist unter (4) angegeben.

Primer- komb.	Bande Nr.	Pop.	kartiert (1)	gekop- pelt (2)	Chrom (3)	Unter gr. (4)	Primer- komb.	Bande Nr.	Pop.	kartiert (1)	gekop- pelt (2)	Chrom (3)	Unter gr. (4)	
E32M60	1	1	x		6	92	E32M61	8	1		x	6	90	
	2	1	x		5a	66		9	1		x	5a	65	
	3	1		x	1	6		10	1	x		5b	77	
	4	1	x		3	32		12	1	x		3	36	
	5	1		x	5a	59		13	1	x		3	39	
	6	1		x	6	93		14	1	x		6	92	
	7	1	x		5a	65		E33M62	1	1	x		6	91
	8	1	x		5a	66			2	1	x		6	93
	9	1	x		5a	54			3	1	x		1	4
	11	1		x	2	19			4	1	x		6	92
	12	1	x		5a	63			6	1		x	3	32
	E32M61	1	1		x	3			36	8	1	x		3
2		1				53	9	1	x		2	17		
3		1	x		4	88	11	1	x		5a	67		
4		1	x		6	92	12	1	x		6	89		
5		1	x		6	92	13	1	x		5a	56		
6		1	x		5a	69	E35M48	1	1		x	1	5	
7		1		x	5a	63		2	1	x		3	32	

Primer- komb.	Bande Nr.	Pop.	kartiert (1)	gekop pelt (2)	Chrom (3)	Unter gr. (4)	Primer- komb.	Bande Nr.	Pop.	kartiert (1)	gekop pelt (2)	Chrom (3)	Unter gr. (4)	
E35M48	3	1		x	6	90	E36M36	5	2	x		6	89	
	4	1						6	2		x	6	90	
	5	1	x		3	33		7	2	x		1	6	
	6	1		x	1	5		10	2	x		6	90	
	7	1		x	5a	63		11	2	x		5b	80	
	8	1		x	6	91		12	2	x		6	90	
	9	1	x		3	38		13	2	x		6	90	
	10	1		x	5a	63		14	2	x		5a	61	
	E35M59	1	1	x		5a		62	15	2	x		6	90
		2	1	x		5b		82	16	2	x		5a	59
3		1		x	6	86	17	2						
4		1		x	1	6	18	2		x	2	22		
5		1					19	2						
7		1	x		1	4	22	1		x	5a	61		
8		1	x		5a	68	23	1	x		5a	67		
9		1		x	5b	70	24	1	x		1	10		
10		1	x		3	36	25	1	x		1	7		
12		1	x		7	102	26	1	x		1	7		
13		1		x	3	36	27	1	x		2	22		
14		1		x	7	98	28	1	x		3	34		
E35M60		1	1		x	1	5	29	1	x		1	11	
		2	1		x	5b	90	30	1					
	3	1	x		3	32	E36M40	1	2		x	3	29	
	4	1		x	5a	62		2	2		x	6	92	
	5	1	x		5a	69		4	2		x	3	31	
	6	1	x		1	6		6	2	x		1	7	
	7	1	x		5b	79		7	2	x		1	1	
	8	1	x		1	5		8	2	x		5a	65	
	9	1		x	1	6		9	2	x		2	19	
E35M61	1	1	x		5b	84		10	2		x	7	98	
	2	1		x	4	48		12	2	x		4	48	
	3	1	x		4	47	16	1		x	1	5		
	4	1	x		1	7	17	1		x	1	5		
	5	1		x	1	5	18	1		x	1	5		
	6	1		x	1	5	19	1						
	8	1	x		2	22	20	1	x		5b	73		
	9	1		x	5a	63	E36M62	1	1	x		4	44	
	10	1		x	1	5		2	1	x		4	45	
	11	1		x	5a	63		4	1	x		4	52	
	13	1	x		5b	82		5	1		x	1	5	
	15	1		x	1	5		6	1	x		1	5	
	16	1	x		1	10		7	1	x		6	89	
	E36M36	2	2	x		3		31	8	1	x		5a	66
		4	2		x	4		47	10	1	x		3	39

Primer- komb.	Bande Nr.	Pop.	kartiert (1)	gekop pelt (2)	Chrom (3)	Unter gr. (4)	Primer- komb.	Bande Nr.	Pop.	kartiert (1)	gekop pelt (2)	Chrom (3)	Unter gr. (4)
E36M62	12	1	x		6	91	E37M38	c	1,2		x	5a	64
E37M32	2	2					E37M40	2	2		x	1	2
	3	2		x	5a	63		4	2		x	3	31
	8	2		x	6	92		5	2	x		1	2
	10	2	x		4	49		8	2	x		2	18
	11	2						10	2	x		4	49
	13	2		x	4	48		13	2	x		1	4
	16	2						14	2		x	2	22
	17	2		x	1	5		15	2	x		2	22
	20	2						16	2		x	5b	79
	22	2		x	6	93		17	1				
E37M33	1	2	x		5a	63		19	1	x		2	22
	3	2	x		5a	58		20	1	x		6	91
	4	2						21	1		x	6	91
	5	2						24	1	x		4	43
	7	2	x		5a	61		25	1		x	1	5
	11	2	x		2	19		a	1,2	x		7	99
	14	2		x	5a	68		b	1,2	x		7	101
	16	2		x	4	49		c	1,2		x	5a	66
	20	2		x	5b	80		d	1,2	x		3	35
	21	1		x	1	5	E37M48	1	1	x		2	24
	22	1	x		4	41		2	1	x		4	52
	23	1	x		1	11		3	1				
	26	1	x		2	14		3B	1		x	5a	65
	28	1		x	5a	67		4	1	x		6	92
	30	1						6	1	x		4	51
	a	1,2	x		5a	61		7	1	x		5a	60
	b	1,2	x		6	90		8	1		x	6	93
	c	1,2	x		6	88	E37M60	1	1		x	1	5
	d	1,2		x	6	89		2	1	x		5b	73
E37M38	1	2	x		6	96		3	1		x	5b	83
	2	2	x		4	49		4	1		x	1	4
	3	2	x		2	23		5	1		x	1	5
	4	2	x		6	94		6	1	x		3	36
	7	2		x	2	17		7	1	x		1	12
	10	2	x		5a	65		8	1	x		6	86
	12	2	x		7	100		9	1	x		2	19
	13	2	x		6	90		10	1	x		1	7
	14	2	x		6	60	E37M61	1	1		x	6	94
	15	2	x		5a	65		2	1	x		5a	58
	16	2	x		4	50		3	1		x	1	5
	19	1						4	1	x		7	103
	a	1,2	x		3	34		5	1	x		5a	64
	b	1,2		x	5a	58		6	1	x		3	38

Primer-komb.	Bande Nr.	Pop.	kartiert (1)	gekop pelt (2)	Chrom (3)	Unter gr. (4)	Primer-komb.	Bande Nr.	Pop.	kartiert (1)	gekop pelt (2)	Chrom (3)	Unter gr. (4)	
E37M61	7	1	x		7	100	E40M33	2	2	x		5a	64	
	8	1	x		5a	60		4	2					
	9	1	x		2	14		5	2	x		1	5	
	10	1	x		2	17		7	2		x	4	46	
E38M61	1	1	x		6	92	10	2						
	2	1		x	2	20	11	2	x		5b	70		
	3	1	x		6	87	19	2	x		1	2		
	5	1	x		5a	63	E40M38	5	2	x		5b	81	
	7	1		x	2	15		9	2	x		6	95	
	8	1						14	2	x		3	26	
	9	1	x		1	13		19	2	x		4	48	
	11	1	x		5a	64		20	2	x		3	27	
	12	1	x		6	87		21	2	x		2	18	
	13	1	x		3	39		23	2	x		2	21	
	E40M32	1	2	x		4		50	24	1		x	3	36
		4	2	x		5b		83	29	1		x	5a	61
		5	2		x	2		17	32	1		x	6	88
9		2	x		5b	77		34	1		x	1	7	
11		2	x		1	5		35	1		x	1	6	
16		2	x		5a	58		36	1		x	5b	76	
17		2		x	6	90	37	1		x	1	3		
18		2	x		6	92	a	1,2	x		6	91		
19		2	x		5b	73	b	1,2	x		5a	57		
20		2					c	1	x		3	30		
21		2		x	3	32	d	2	x		6	95		
24		2		x	3	29	e	1,2	x		1	6		
25		2	x		4	49	E40M40	1	2					
26		2		x	3	32		2	2	x		3	30	
29		1		x	2	15		3	2	x		4	49	
31		1	x		5b	87		4	1		x	5a	58	
32		1	x		2	21		6	1		x	5a	66	
34		1	x		3	28		7	1	x		5b	74	
36		1		x	1	8		9	1		x	5a	55	
40		1		x	4	49		10	1		x	6	94	
41		1	x		6	91		12	1	x		3	36	
42		1		x	6	91		13	1		x	1	2	
45		1	x		4	49		14	1		x	5a	55	
a		1,2	x		7	101		15	1		x	5a	68	
b		1,2	x		4	47		16	1	x		7	98	
c		1,2		x	4	48	17	1	x		4	50		
d		1,2	x		1	9	19	1						
e		1,2	x		2	23	E41M32	1	2		x	5b	79	
f		1,2						2	2	x		5b	77	
g		1,2	x		5a	57		4	2					

Primer- komb.	Bande Nr.	Pop.	kartiert (1)	gekop pelt (2)	Chrom (3)	Unter gr. (4)	Primer- komb.	Bande Nr.	Pop.	kartiert (1)	gekop pelt (2)	Chrom (3)	Unter gr. (4)		
E41M32	7	2		x	6	92	E41M38	18	1	x		2	15		
	10	2	x		2	23		19	1		x	1	5		
	11	2	x		2	19		20	1		x	5b	70		
	18	2	x		2	20		21	1	x		1	5		
	20	1	x		7	98		22	1	x		2	16		
	21	2	x		6	93		25	1		x	5a	69		
	22	1			x	2		18	28	1		x	1	11	
	23	1	x		1	11		29	1	x		6	95		
	24	1	x		6	92		31	1	x		3	31		
	26	1	x		5b	85		a	1	x		5a	57		
	28	1	x		3	30		b	1,2	x		2	22		
	29	1			x	6		92	c	1	x	5a	56		
	31	1			x	7		99	E41M40	3	2	x		6	90
	32	1	x		3	30		4		2					
33	1	x		5a	60	5	2	x			1	5			
a	1,2					6	2	x			7	101			
b	1,2	x		2	22	11	2	x			6	90			
c	1	x		3	29	14	2	x			2	19			
E41M33	1	2		x	4	48	17	2		x		3	35		
	3	2		x	3	32	19	1		x		6	86		
	4	2	x		6	95	20	1		x		6	86		
	5	2					21	1			x	1	5		
	6	2	x		6	97	24	1			x	5a	61		
	13	2	x		1	7	26	1	x		3	30			
	19	2					27	1		x	2	16			
	20	2	x		2	19	29	1		x	6	93			
	21	2	x		2	19	a	1		x	5b	85			
	23	2					b	1,2		x	2	17			
	25	2	x		3	29	c	1,2	x		5b	71			
	26	1			x	5a	66	E41M48	4	1	x		7	99	
	27	1	x		6	94	5		1		x	6	88		
	28	1			x	5a	56		6	1					
29	1	x		1	7	7	1		x		2	15			
30	1	x		6	92	8	1		x		5a	65			
34	1	x		4	46	9	1		x		1	13			
37	1	x		3	31	10	1	x		7	98				
a	1	x		3	36	11	1								
b	1,2			x	1	7	12	1		x	3	38			
c	1,2	x		2	19	E42M32	1	2							
E41M38	4	2						4	2	x		2	19		
	11	2	x		1		2	5	2	x		2	19		
	14	2	x		6		94	8	2	x		1	1		
	15	2						9	2		x	3	36		
	16	2	x		3	34	13	2							

Primer- komb.	Bande Nr.	Pop.	kartiert (1)	gekop pelt (2)	Chrom (3)	Unter gr. (4)	Primer- komb.	Bande Nr.	Pop.	kartiert (1)	gekop pelt (2)	Chrom (3)	Unter gr. (4)		
E42M32	16	2		x	2	21	E42M38	4	2	x		4	47		
	18	2	x		6	92		6	2	x		7	101		
	20	2	x		5b	75		7	2	x		3	30		
	21	2	x		3	29		8	2	x		1	9		
	24	2						9	2			x	3	36	
	25	2			x	5b		80	19	2	x		3	34	
	34	1	x		4	45		21	2	x		7	103		
	35	1	x		5a	55		22	2	x		1	3		
	36	1	x		3	26		25	2	x		5a	64		
	a	1						29	1	x		5b	78		
b	1,2	x		6	90	30	1	x		3	27				
c	1,2	x		1	2	33	1			x	2	20			
E42M33	1	2	x		1	9	36	1	x		5a	68			
	2	2	x		4	47	38	1	x		5a	62			
	6	2					42	1	x		2	16			
	7	2	x		4	48	a	2							
	8	2	x		4	49	c	1	x		1	13			
	9	2	x		5b	75	E42M40	1	2	x		5a	78		
	10	2	x		5a	60		2	2			x	5b	67	
	13	2	x		2	24		3	2			x	6	90	
	14	2	x		3	29		7	2			x	3	36	
	15	2	x		1	6		8	2	x		5b	76		
	17	1			x	5b		80	10	2			x	6	90
	19	1	x		3	40		13	2	x		4	49		
	20	1			x	6		92	14	2	x		7	100	
	21	1			x	2		17	18	2					
	23	1	x		7	100		26	1	x		2	25		
	25	1			x	1	5	27	1	x		2	25		
	26	1			x	1	6	30	1	x		1	2		
	27	1	x		1	5	32	1			x	5a	58		
	28	1	x		6	92	33	1	x		3	37			
	30	1			x	1	12	34	1	x		5a	55		
33	1	x		6	88	35	1			x	5a	68			
a	1,2			x	6	90	a	1,2	x		4	50			
b	1	x		1	12	33	b	1			x	6	94		
c	1			x	2	14	c	1,2			x	3	36		
E42M38	2	2		x	6	88	d	1,2	x		1	7			
	3	2	x		2	20									

### RFLP-Analyse

Die Analyse mit den kodominanten RFLP-Markern diente der Zuordnung der AFLP-Marker zu den sieben Chromosomen. Dazu wurden RFLP-Sonden verwendet, deren Lage in den Chromosomen A von *T. aestivum* und *T. monococcum* bekannt ist. Aufgrund einer hohen Kolinearität zwischen *T. aestivum* und *T. monococcum* und einer übereinstimmende Kopplung mehrerer Triticum-Sonden einer Chromosomennummer mit einer Kopplungsgruppe von AFLP-Markern des Einkorngensoms konnten die Chromosomennummern von *T. monococcum* zugeordnet werden.

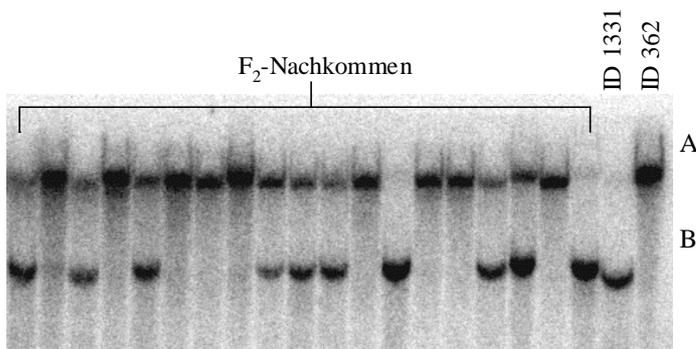


Abb.8: Phosphorimager-Darstellung einer RFLP-Analyse von Population 1 mit der weizengenomischen Sonde WG983. F<sub>2</sub>-Nachkommen mit Bande A sind homozygot zu ID362, solche mit Bande B zu ID1331, während Nachkommen mit beiden Banden heterozygote F<sub>2</sub>-Pflanzen darstellen.

Die RFLP-Analyse wurde bei der Qualitätspopulation mit 116, bei der Kartierungspopulation mit 89 RFLP-Markern durchgeführt, von denen achtzehn, bzw. zwanzig Sonden polymorphe Signale ergeben haben (Tab.4, Abb.8). Von den achtzehn, bzw. zwanzig polymorphen RFLP-Markern waren acht auf beiden Populationen polymorph. Bei 28 Sonden konnte eine mit dem Weizen

übereinstimmende Kartierung auf dem Einkorngenom determiniert werden, während die beiden Sonden PSR128 und WG282 bei Weizen und Einkorn auf verschiedenen Chromosomen kartieren. PSR128 kartiert in Weizen auf dem langen Arm von Chromosom 5, wurde in dieser Arbeit aber auf dem Chromosom 1 von Einkorn lokalisiert. Der Marker WG282 kartiert in Weizen auf dem langen Arm von Chromosom 6, hier konnte er auf Chromosom 4 lokalisiert werden (siehe Diskussion). Acht Marker waren für beide Populationen identisch und konnten als Anker für die Erstellung einer integrierten Karte dienen (Tab.4).

Tab.4: RFLP-Marker und ihre Positionen auf den Chromosomen des Chromosomensatzes A von *Triticum*-Arten und auf den Einkornpopulationen 1 und 2. In der Tabelle ist angegeben, ob die Sonde auf einem spezifischen Locus kartiert oder sich lediglich einer Kopplungsgruppe zuordnen ließ. Die ermittelte Chromosomennummer im Einkornchromosom ist unter (1) aufgeführt, die der Chromosomenuntergruppe unter (2).  
 (\*) siehe auch Abb. 9 und Tab. 3

Symbol	Kopplungs- - gruppe in anderen Triticum Arten	Pop.	Sonde kartiert auf einem spezifischen Locus	Sonde koppelt nur mit Chrom.	Kopplungs- gruppe des Einkorn Chromosoms (1)	Unter- gruppe (2) (*)
WG983	1L	1	X			7
PSR601	1L	1	X		1	7
Glu1	1L	2	X			8
Gli1	1S	2	X			8
PSR102	2L	1	X			21
PSR934	2L	1	X		2	15
WG996	2L	2	X			18
WG178	3L	1,2	X			31
PSR931	3L	1,2	X		3	37
PSR910	3S	2	X			30
PSR105 1	4S	1,2		X		46
PSR131 6	4L	1	X		4	42
WG464	4	2		X		48
PSR604	5L o 4L	1,2	X			57
WG199	5	1	X			59
CDO412	5L	1	X			80
PSR164	5L	1,2		X		79
CDO590	5L	1	X			83
PSR637	5L	1,2	X		5	74
WG114	5L	2		X		80
WG364	5L	2	X			72
WG1026	5L	2		X		74
WG644	5L	2	X			78
WG223	6	1		X		93
PSR113	6S	1	X		6	93
PSR627	6S	2	X			88
WG420	7	1,2		X	7	100
WG380	7	1,2	X			102

### Genkarten-Berechnung

Für die Kartierung wurden die molekularen Daten der beiden Populationen zunächst auf Segregationsstörungen hin untersucht. Die Analyse der Datenqualität wurde durch das Programm JoinMap (Stam, 1993; Stam und Van Ooijen, 1995) mit dem  $\chi^2$ -Test durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Analyse geben Aufschluß darüber, ob die Abweichung des Segregationsmusters von der erwarteten 3:1-, bzw. 1:2:1-Spaltung als zufällig angesehen werden kann und die molekularen Daten damit signifikant sind, oder ob die Segregation gestört ist, was durch eine zu hohe Abweichung von der erwarteten Spaltung sichtbar wird. Das in der Statistik standardmäßig verwendete Signifikanzniveau liegt bei  $\alpha > 5\%$ . Größere Werte von  $\alpha$  bedeuten eine stärkere, kleinere Werte eine entsprechend schwächere Signifikanz.

Tab.5: Anzahl der molekularen Marker, deren Segregation in Population 1 und 2 mit einer Signifikanz von  $\alpha > 10\%$ ,  $\alpha > 5\%$  und  $\alpha < 5\%$  dem erwarteten Wert einer 3:1-, bzw. 1:2:1-Spaltung entspricht. Daten mit einem Wert von  $\alpha > 5\%$  werden in der Statistik als signifikant angenommen.

	Pop 1	Pop 2
Anzahl Marker mit $\alpha > 10\%$	269	214
Anzahl Marker mit $\alpha > 5\%$	37	2
Anzahl Marker mit $\alpha < 5\%$	6	0

Die Ergebnisse der hier durchgeführten Untersuchung sind in Tabelle 5 dargestellt. Von den 312 Markern (294 AFLP-Marker und 18 RFLP-Marker) mit denen die Qualitätspopulation analysiert wurde, liegt das Signifikanzniveau bei 269 Markern über 10%, bei 37 Markern zwischen 5% und 10% und nur sechs Marker haben einen Wert unter 5%. Bei der

Kartierungspopulation haben 214 Marker von 216 (196 AFLP-Marker, 20 RFLP-Marker) ein Signifikanzniveau  $\alpha$  von über 10% und lediglich bei zwei Markern liegt  $\alpha$  zwischen 5% und 10%. Kein Marker der Kartierungspopulation hat einen  $\alpha$ -Wert unter 5%.

Von allen Markern aus Tabelle 5 wurde für jede Population einzeln eine Kopplungsanalyse durchgeführt und die paarweisen Daten der beiden Populationen in einer gemeinsamen Datei gespeichert. Für die Integration der Datensätze der beiden Populationen standen JoinMap 27 identische AFLP-Banden und acht gemeinsame RFLP-Marker als Anker zur Verfügung. Diese verteilten sich wie in Tabelle 6 dargestellt auf die sieben Chromosomen. Für die Berechnung einer integrierten Karte wurden anschließend die Marker bei einem

Tab.6: Verteilung der gemeinsamen AFLP- und RFLP-Marker, die für die Integration der Datensätze der Populationen 1 und 2 benötigt werden, über die Kopplungsgruppen der sieben Einkornchromosomen

Chrom.	Anzahl AFLP-Marker	Anzahl RFLP-Marker
1	4	0
2	5	0
3	3	2
4	3	1
5a	1	1
5b	2	2
6	5	0
7	2	2

Wahrscheinlichkeitswert von  $LOD > 3,0$  (siehe 1.2.1) Kopplungsgruppen, bei denen die Markerreihenfolge noch unbestimmt ist, zugeordnet. Mit Hilfe der RFLP-Anker konnten acht Kopplungsgruppen identifiziert werden, welche die sieben Einkornchromosomen repräsentieren. Chromosom 5 wird dabei von zwei Kopplungsgruppen abgedeckt.

Insgesamt konnten von 528 polymorphen Markern 455 Marker einer Kopplungsgruppe zugeordnet werden. Die Kopplungsgruppen der Chromosomen 1-7 umfassen insgesamt 84, 57, 60, 41, 73, 40, 79, bzw. 21 Marker (Tab.7), von denen bei den JoinMap-Parametern Jump- und Triplet-Wert 6 die Karten berechnet wurden. Es kommt lediglich bei den Chromosomen 1 und 2 zu einer Bildung von fünf bzw. einer fixierten Markeranordnung (siehe Punkt 2.2.4, Material und Methoden).

		Kopplungsgruppe	1	2	3	4	5a	5b	6	7	ges.
<b>Anzahl gekoppelter Marker</b>	<b>nur Pop.1 (1)</b>		59	28	33	18	54	20	45	11	268
	<b>nur Pop. 2 (2)</b>		21	24	22	20	15	17	29	6	154
	<b>gemeinsame (3)</b>		4	5	5	3	4	3	5	4	33
	<b>Summe (4)</b>		84	57	60	41	73	40	79	21	455

Tab 7: Anzahl der molekularen Marker und ihre Aufteilung auf die acht Kopplungsgruppen, welche die sieben Einkornchromosomen repräsentieren. Es ist sowohl die Anzahl Marker die von Population 1 (1), bzw. Population 2 (2) stammen, als auch die der gemeinsamen Marker (3) und die Gesamtzahl (4) angegeben.

Die berechneten Karten der sieben Einkornchromosomen sind in Abbildung 9 dargestellt. Die sieben Chromosomen decken eine Genom-Größe von 1066cM ab, mit insgesamt 306 Markern und einem durchschnittlichen Markerabstand von 3,48cM (Tab.8). Markerabstände von mehr als 15cM treten lediglich bei den Chromosomen 1, 4 und 6 auf. Bei Chromosom 1 ist zwischen den Markern PSR128 und E4232c ein Abstand von 17cM, Chromosom 4 weist eine Distanz von 35cM zwischen den Markern E37482 und E32613 auf und bei Chromosom 6 kommen Markerabstände von 17 bzw. 22 cM zwischen den Markern E37608 und E403231, bzw. E373801 und E413306 vor.

		Kopplungsgruppe	1	2	3	4	5a	5b	6	7	ges.
<b>Anzahl kartierter Marker</b>	<b>Pop. 1 (1)</b>		28	19	28	15	30	13	28	9	170
	<b>Pop. 2 (2)</b>		19	19	12	14	12	12	20	5	113
	<b>gemeinsame (3)</b>		3	4	4	2	2	2	3	3	23
	<b>Summe (4)</b>		50	42	44	31	44	27	51	17	306
	<b>Kartenlänge (5) [cM]</b>		169	177	169	129	120	109	146	47	1066
	<b>mittlerer Markerabstand (6) [cM]</b>		3,38	4,21	3,84	4,16	2,73	4,04	2,86	2,76	3,48

Tab.8: Tabellarische Darstellung der Genkarten der sieben Einkornchromosomen. Es ist die Anzahl kartierter Marker, die von Population 1 (1), bzw. Population 2 (2) stammen, sowie die der gemeinsamen Marker (3) angegeben. (4) gibt die Gesamtanzahl Marker auf den Chromosomen an. Die Kartenlänge in centi Morgan bzw. der mittlere Marker-abstand auf den Chromosomen ist unter (5), bzw. (6) abzulesen. Die Spalte "ges." beinhaltet die Summen der Werte aller sieben Einkornchromosomen.

Chromosom 5 ist aufgrund fehlender Kopplung in zwei Gruppen unterteilt, die hier als Chromosom 5a und 5b bezeichnet werden. Über die genaue Länge des gesamten Chromosoms lassen sich aufgrund der fehlenden molekularen Information, die hier zu der Zweiteilung geführt hat keine Aussagen machen. Über die Verteilung der gemeinsamen Marker, die für die Integration der beiden Datensätze benötigt wurden, gibt die Abbildung 10, die eine schematische Darstellung der sieben Chromosomen enthält, Auskunft.

Chromosom 1

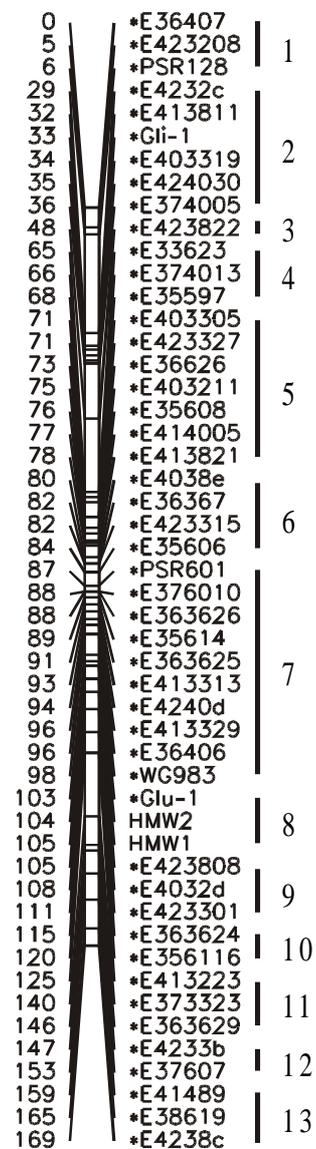
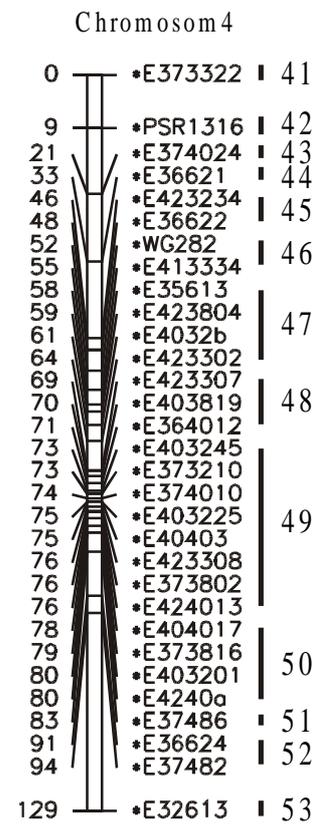
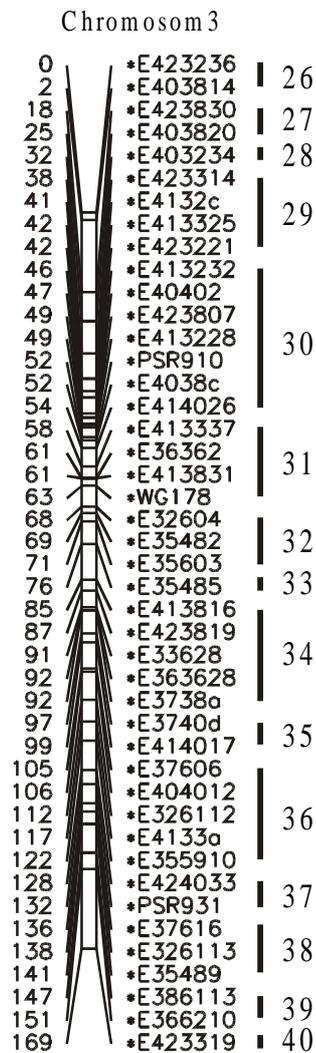
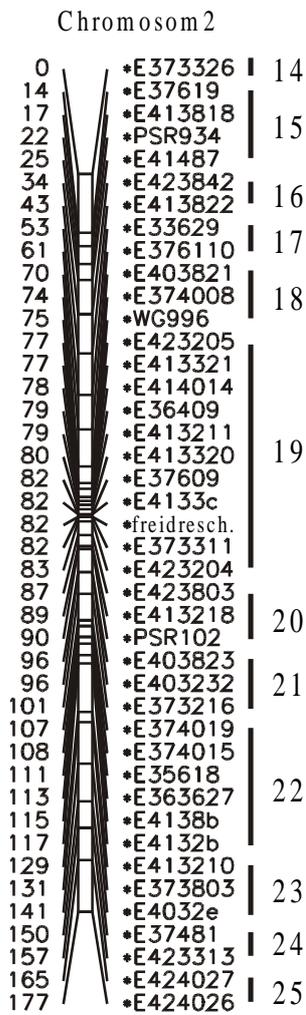
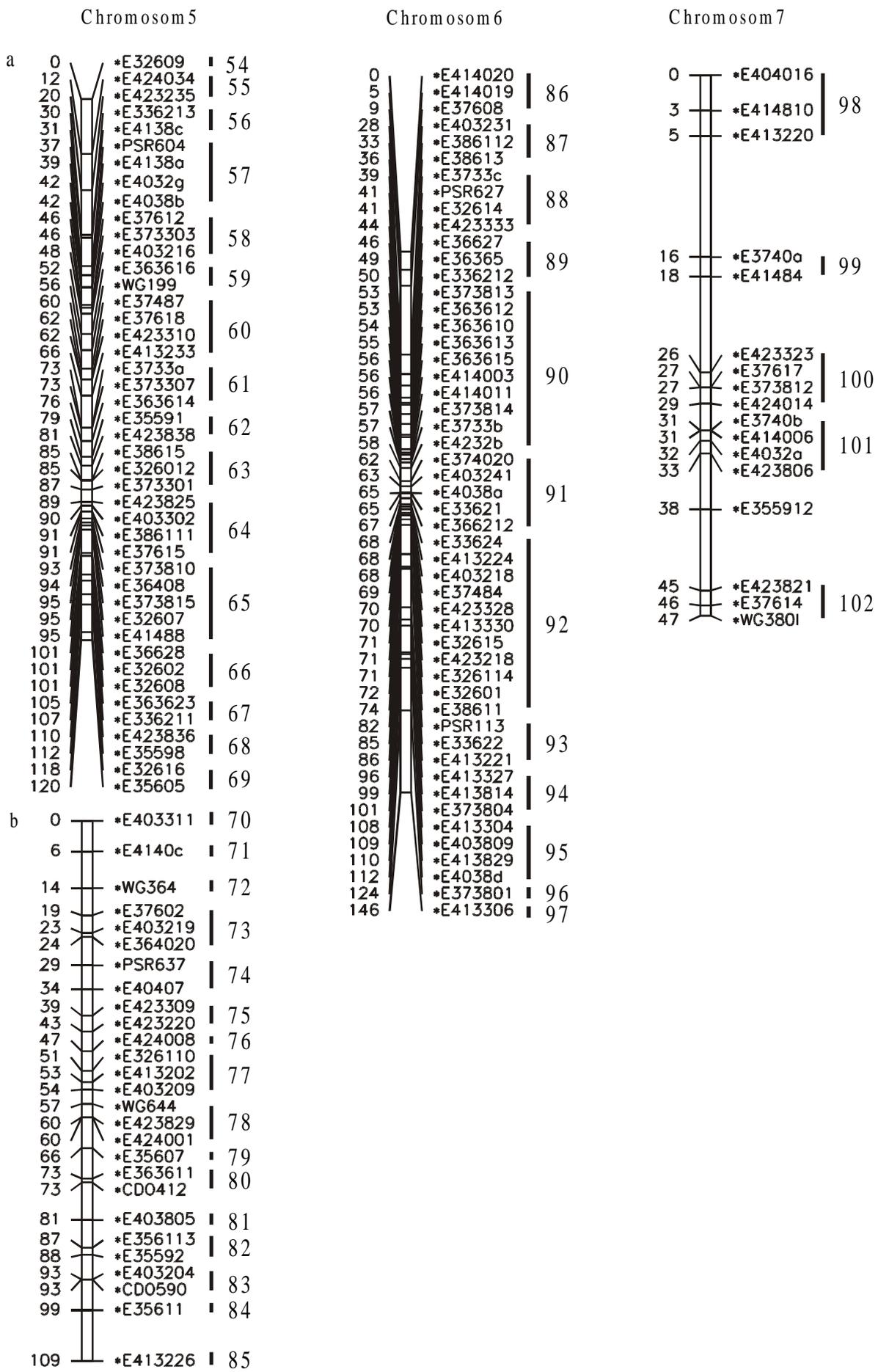


Abb.9: Integrierte Karten der sieben Einkornchromosomen mit AFLP- und RFLP-Markern. Die Zahlen auf der linken Seite des Chromosomenrückrades geben die Summe der centi Morgan zwischen den Markern an. Die Chromosomen werden in Untergruppen unterteilt, die durch Striche und Zahlen auf der rechten Seite der Chromosomen markiert sind (siehe Material und Methode, Punkt 2.2.4). Die hier dargestellte Länge der Chromosomen entspricht nicht der tatsächlichen berechneten Länge, sondern entsteht durch die Anzahl der kartierten Marker. Die Chromosomenlänge in centi Morgan ist an der cM-Zahl des letzten Markers jedes Chromosoms abzulesen





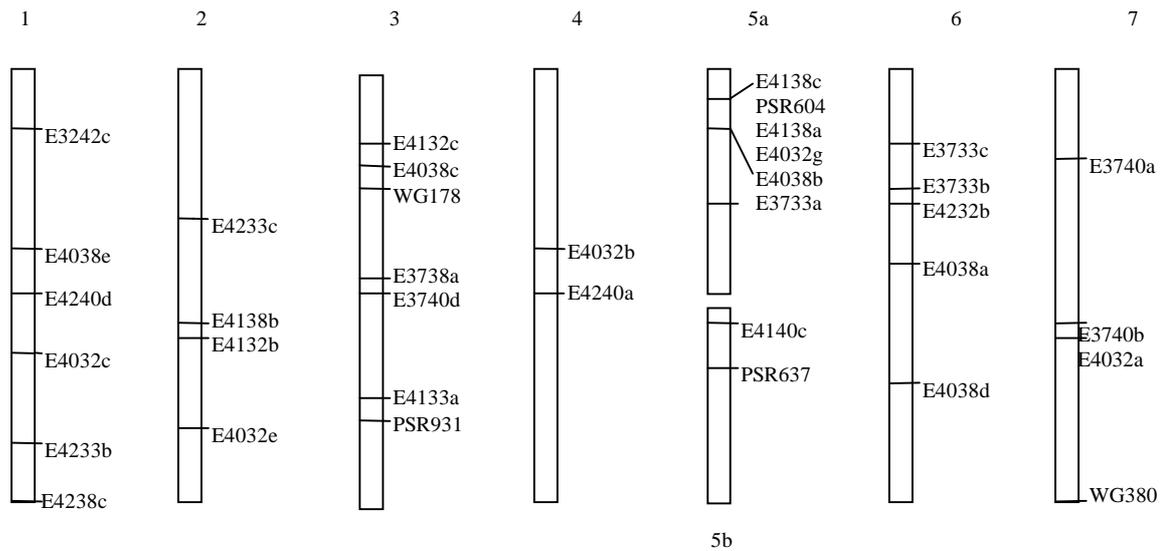


Abb.10: Schematische Darstellung der sieben Einkornchromosomen. Es sind nur die gemeinsamen Marker der beiden Populationen dargestellt. Die Größe der Chromosomenabbildungen ist standardisiert und entspricht nicht der relativen Größe der jeweiligen Chromosomen. Die Abbildung stellt eine Übersicht über die Verteilung der für die Integration der beiden Datensätze genutzten gemeinsamen Marker über das gesamte Genom dar.

Die so berechneten Genkarten bildeten die Basis für die Identifizierung und Lokalisierung der QTLs für die Backqualität. Dafür wurde als nächstes das phenotypische Merkmal Backqualität bei den Nachkommen der Qualitätspopulation analysiert.

### 3.2 Analyse der Backqualität

Basierend auf den Werten der  $F_3$ -Nachkommenschaften wurde die Backqualität der einzelnen  $F_2$ -Individuen der Qualitätspopulation hier durch den SDS-Sedimentationsvolumentest und den Proteingehalt des Mehls bestimmt. Der Quotient aus beiden wurde als Maß für die Backqualität der Nachkommen der Qualitätskreuzung ID 1331 x ID 362 genommen. Ein BQ-Quotient um 2,0 zeigt eine gute Backqualität an, während ein Quotient um 0,5 eine schlechte Qualität bedeutet. Da die Backqualität abhängig von Klimaeinflüssen ist, sind die Werte je nach Jahr und Ort unterschiedlich. Die durchschnittliche Qualität in S.Angelo ist im Vergleich zu Köln nach Untersuchungen von Borghi *et al.* (1996) besser. Das ließ sich auch in diesen Untersuchungen belegen (Abb.11).

Die Werte für Backqualität zeigen in allen vier Untersuchungen annähernd eine Normalverteilung, die je nach Jahr zu besseren oder schlechteren Werten hin verschoben ist. Die flache, aber breit verteilte Kurve von Köln 1996 zeigt im Vergleich zu den Jahren 1997 und 1998 eine

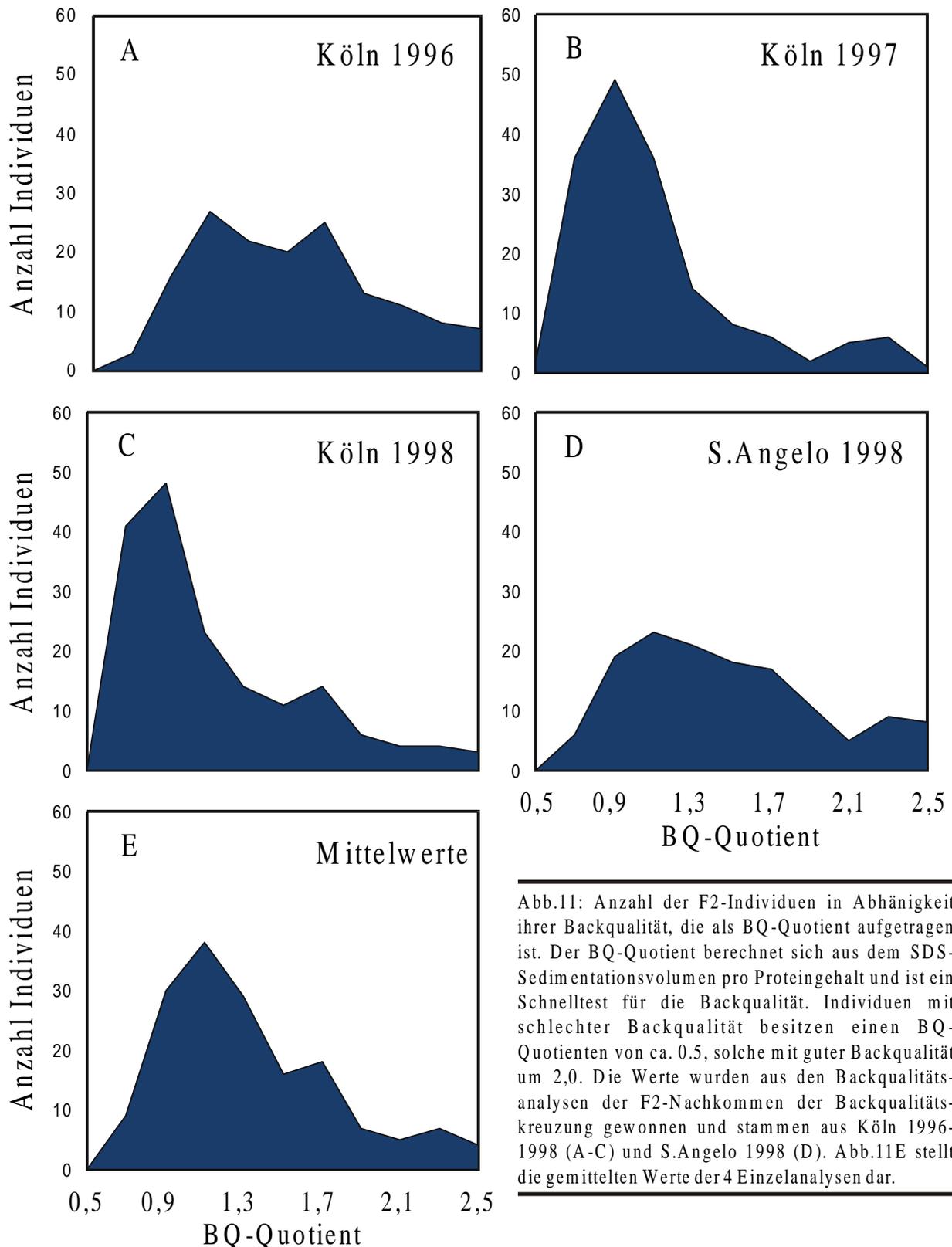


Abb.11: Anzahl der F2-Individuen in Abhängigkeit ihrer Backqualität, die als BQ-Quotient aufgetragen ist. Der BQ-Quotient berechnet sich aus dem SDS-Sedimentationsvolumen pro Proteingehalt und ist ein Schnelltest für die Backqualität. Individuen mit schlechter Backqualität besitzen einen BQ-Quotienten von ca. 0,5, solche mit guter Backqualität um 2,0. Die Werte wurden aus den Backqualitätsanalysen der F2-Nachkommen der Backqualitätskreuzung gewonnen und stammen aus Köln 1996-1998 (A-C) und S. Angelo 1998 (D). Abb.11E stellt die gemittelten Werte der 4 Einzelanalysen dar.

große Anzahl Individuen in guten Qualitätsbereichen. In den Jahren Köln 1997 und 1998 liegt die Anzahl der Individuen mit einer Qualität unter dem mittleren Backqualitätswert (ca. 1,5) bei 83% bzw. 75%. Während das Jahr 1998 in Köln vergleichsweise schlechte Backqualitäten ergab, zeigt die Kurve von S. Angelo einen Anteil Individuen über dem mittleren Backqualitätswert von ca. 50%. Um die QTL-Analyse unabhängig von Umwelteinflüssen durchführen zu können, wurden die Mittelwerte aus den Jahren 1996 bis 1998 in Köln und den Qualitätswerten

1998 aus S. Angelo berechnet (Abb.11 E). Die Kurve ist etwas zu den schlechteren Werten verschoben. Der Anteil Individuen, deren Qualität unter dem mittleren Backqualitätswert liegt, ist ca. 65%. Für die QTL-Analyse wurden sowohl die Einzel- als auch die Mittelwerte in ein für MAPMAKER lesbares Format gebracht und waren so einer statistischen Auswertung zugänglich.

### 3.3 QTL-Analyse

Die QTL-Analyse wurde mit dem Intervallkartierungsverfahren von Lander und Botstein (1989) durchgeführt. Das verwendete Computerprogramm war MAPMAKER/QTL Version 1.1b, das anhand von LOD-Werten die wahrscheinlichste Position eines QTL im Genom lokalisiert. Für die Identifizierung und Lokalisierung der QTLs benötigt das Programm eine Genkarte und Informationen über das quantitative Merkmal jedes Nachkommen. Um MAPMAKER/QTL eine Genkarte zugänglich zu machen, müssen molekulare oder Sequenzinformationen vorher von MAPMAKER/Exp. in die dem Programm MAPMAKER/QTL entsprechende Form gebracht werden. Da MAPMAKER nicht mit integrierten Informationen aus verschiedenen Kartierungsexperimenten rechnen kann, wurden die der Qualitätspopulation stammenden Informationen in Form von Markerrahmen für die QTL-Berechnung zur Verfügung gestellt (siehe Material und Methoden, Punkt 2.2.5.1).

#### 3.3.1 Markerrahmen für die QTL-Berechnung

Für die Erstellung der Markerrahmen wurde das Programm MAPMAKER/Exp. Version 3.0 genutzt. Dem Programm wurden die molekularen Daten der Qualitätspopulation zur Verfügung gestellt und die Markerrahmen auf die in Punkt 2.2.6 in "Material und Methoden" beschriebene Weise berechnet. Die Rahmen sind in Abbildung 12 dargestellt. Sie zeigen bis auf Chromosom 1 eine größere Länge, als die von JoinMap berechneten Chromosomen (Tab.9) und umfassen eine Genomgröße von insgesamt 1696,6 cM, was der ca. 1,5fachen Länge der JoinMap-Karte entspricht.

Tab.9: Länge und durchschnittlicher Markerabstand der mit MAPMAKER berechneten Markerrahmen in centi Morgan

Marker-rahmen	Länge [cM]	mittlerer Markerabstand
1	170,0	7,08
2	328,3	14,9
3	277,5	9,9
4	160,6	11,5
5a	231,0	7,9
5b	174,6	13,4
6	279,0	9,9
7	75,6	6,9
Summe	1696	10,2

Ursachen für diese Kartenausdehnung liegen zum einen in der etwas unterschiedlichen Berechnungsweise der centi Morgan aus den Rekombinationsereignissen (Qi *et al.* 1996) und zum anderen aus der Tatsache, daß MAPMAKER Abstände zwischen Markern berechnen muß, die das Programm aufgrund der fehlenden Dateninformation aus der Kartierungspopulation in dieser Reihenfolge eventuell nicht so berechnet hätte. Die Markerrahmen werden anschließend vom Programm MAPMAKER/QTL geladen und zur Identifizierung und Lokalisierung der QTLs genutzt.

Abb.12: Markerrahmen für die QTL-Analyse der Chromosomen 1, 2, 3, 4, 5a, 5b, 6 und 7 aus den molekularen Daten von der Qualitätspopulation. Chromosom 5 wird von zwei Markerrahmen repräsentiert. Die Markerreihenfolge wurde von dem Computerprogramm JoinMap ermittelt und die Abstände der Marker anschließend von MAPMAKER berechnet (siehe Punkt 2.2.6 in Material und Methoden). Die Distanz in centi Morgan zum jeweils nachfolgenden Marker wird rechts neben dem Marker angegeben.	Chrom. 1		Chrom. 2		Chrom. 3	
	Marker	Distanz	Marker	Distanz	Marker	Distanz
	E4232c	7,0	E373326	17,6	E423226	25,7
	E424030	38,4	E37619	7,3	E423830	22,3
	E33623	10,0	E413818	6,0	E403234	19,4
	E35597	7,4	PSR934	5,9	E4132c	5,6
	E423327	7,6	E41487	11,8	E413232	6,5
	E36626	7,9	E423842	11,0	E413228	3,0
	E35608	1,9	E413822	15,1	E4038c	4,3
	E413821	4,1	E33629	11,0	E414026	6,0
	E4038e	10,6	E376110	57,7	E413337	3,2
	E35606	7,1	E37609	0,2	E413831	2,3
	PSR601	4,0	E4133c	13,7	WG178	6,1
	E376010	0,4	PSR102	9,5	E32604	4,7
	E363626	1,9	E403232	33,9	E35482	2,7
	E35614	4,3	E374019	3,8	E35603	18,4
	E363625	6,8	E35618	4,7	E35485	33,1
	E4240d	0,1	E363627	0,5	E33628	0,8
	E413329	6,4	E4138b	8,1	E363628	9,2
	WG983	7,7	E4132b	52,5	E3740d	11,2
	HMW2	2,7	E4032c	11,7	E37606	0,5
	HMW1	3,7	E37481	20,6	E404012	10,8
	E4032d	11,7	E424027	25,9	E4133a	11,1
	E363624	10,1	E424026	-	E355910	13,1
	E356116	8,5			E424033	9,9
	E413223	-			PSR931	9,6
					E326113	5,6
					E35489	12,8
					E386113	19,6
					E366210	

Chrom. 5a		Chrom. 5b		Chrom. 6		Chrom. 7	
Marker	Distanz	Marker	Distanz	Marker	Distanz	Marker	Distanz
E32609	16,1	E4140c	25,2	E414020	13,4	E404016	5,8
E424034	11,3	E37602	6,3	E37608	25,7	E414810	2,3
E423235	17,2	E364020	7,5	E403231	21,7	E413220	18,3
E336213	2,9	PSR637	8,1	E386112	9,1	E3740a	3,7
E4138c	11,5	E40407	28,3	E38613	7,4	E41484	8,9
PSR604	4,9	E326110	15,0	E3733c	2,7	E423323	6,3
E4138c	4,4	E423829	18,5	E32614	4,1	E37617	0,0
E4032g	0,0	CDO412	23,4	E423333	27,1	E3740b	8,4
E4038b	5,3	E356113	3,9	E3733b	9,2	E4032a	9,5
E37612	21,2	E35592	5,9	E4232b	0,1	E355912	12,4
WG199	7,5	CDO540	12,8	E374020	9,0	E37614	
E37487	1,1	E35611	19,9	E403241	6,3		
E37618	37,9	E413223		E4038a	3,4		
E3733a	12,7			E33621	3,5		
E35591	0,0			E366212	4,2		
E423838	7,2			E33624	0,0		
E326012	3,7			E413224	3,0		
E356111	8,4			E37484	2,0		
E37615	18,3			E423328	0,0		
E41488	3,1			E413330	1,8		
E36628	3,2			E32615	1,8		
E32602	0,5			E326114	4,4		
E32608	5,4			E32601	4,5		
E363623	4,6			E386112	12,0		
E336211	2,9			PSR113	19,3		
E423836	5,8			E33622	63,8		
E35598	7,7			E413327	19,6		
E32616	6,3			E413829			
E35605							

### 3.3.2 Lokalisierung der QTLs für die Backqualität

Die QTL-Analyse wurde sowohl mit den Einzelwerten der Backqualitätsanalyse der verschiedenen Jahre und Standorte, als auch mit den Mittelwerten aus allen vier Daten durchgeführt. Die Backqualitätsdaten in Form des BQ-Quotienten wurden in ein für MAPMAKER/QTL zugängliches Format gebracht und für die Lokalisierung der QTLs verwendet. Das Programm berechnete die LOD-Werte für das Vorkommen eines QTLs entlang des Genoms und konnte dabei QTLs auf den Chromosomen 1, 3 und 5 lokalisieren (Abb.13). Die LOD-Kurven für die

Einzel- und Mittelwerte sind in den Abbildungen 14-16 dargestellt. Je nach Jahr konnten die QTLs mit unterschiedlichen Wahrscheinlichkeiten determiniert werden.

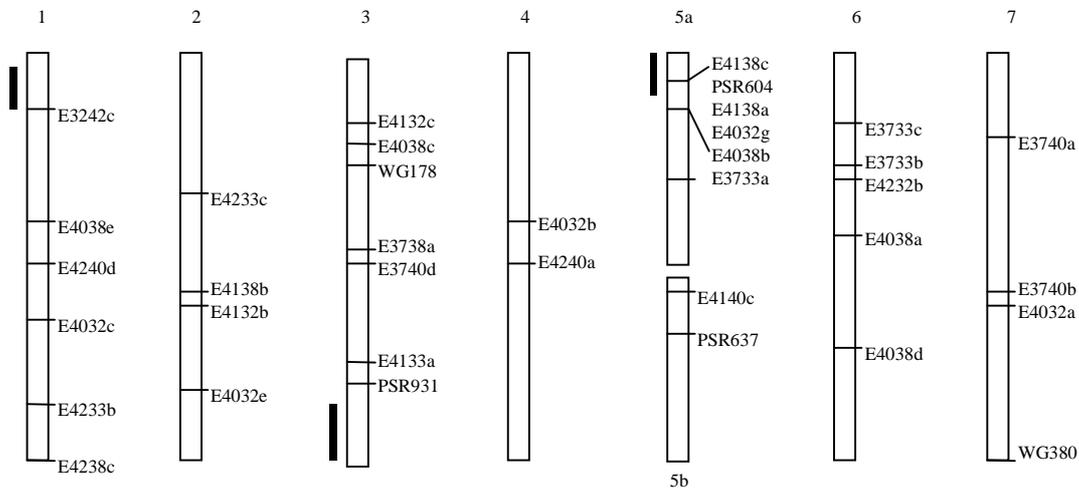


Abb.13: Schematische Darstellung der Lage der drei identifizierten QTLs auf dem Einkorngenom. Die QTLs sind als schwarze Balken links neben den Chromosomen 1, 3 und 5a dargestellt. Für die Darstellung der Chromosomen wurden nur die gemeinsamen Marker genutzt.

### 3.3.2.1 QTL auf Chromosom 1

Auf Chromosom 1 konnte in allen drei Jahren und an beiden Standorten ein QTL im Bereich der Marker E4232c und E33623 determiniert werden (Abb.14). Die LOD-Werte variierten je nach Jahr und Standort zwischen 6,2 (Köln 1996) und 21,8 (Köln 1997). Der QTL verschob sich um wenige centi Morgan zwischen den Positionen 29 und 35 (Tab.10).

Im Jahr 1998 zeigt die LOD-Kurve sowohl in Köln, als auch in S. Angelo ein zweites, bzw. drittes Maximum (Abb.14 C und D). Diese Maxima sind wesentlich geringer, als die Hauptmaxima (Köln: Peak 1  $\hat{=}$  LOD 6,1; Peak 2  $\hat{=}$  LOD 4,2. S. Angelo Peak 1  $\hat{=}$  LOD 15,0; Peak 2  $\hat{=}$  LOD 8,2; Peak 3  $\hat{=}$  LOD 9,5) und liegen weiter proximal.

Bei einer Mittelung der BQ-Werte zeigt die LOD-Kurve ebenfalls ein Zwischenmaxima. Der QTL ließ sich mit einem LOD-Wert von 15,4 in einem CI < 1 cM auf Position 30 lokalisieren. Der zweite Peak liegt ebenfalls im Intervall zwischen den Markern E4232c und E424030 auf Position 33.

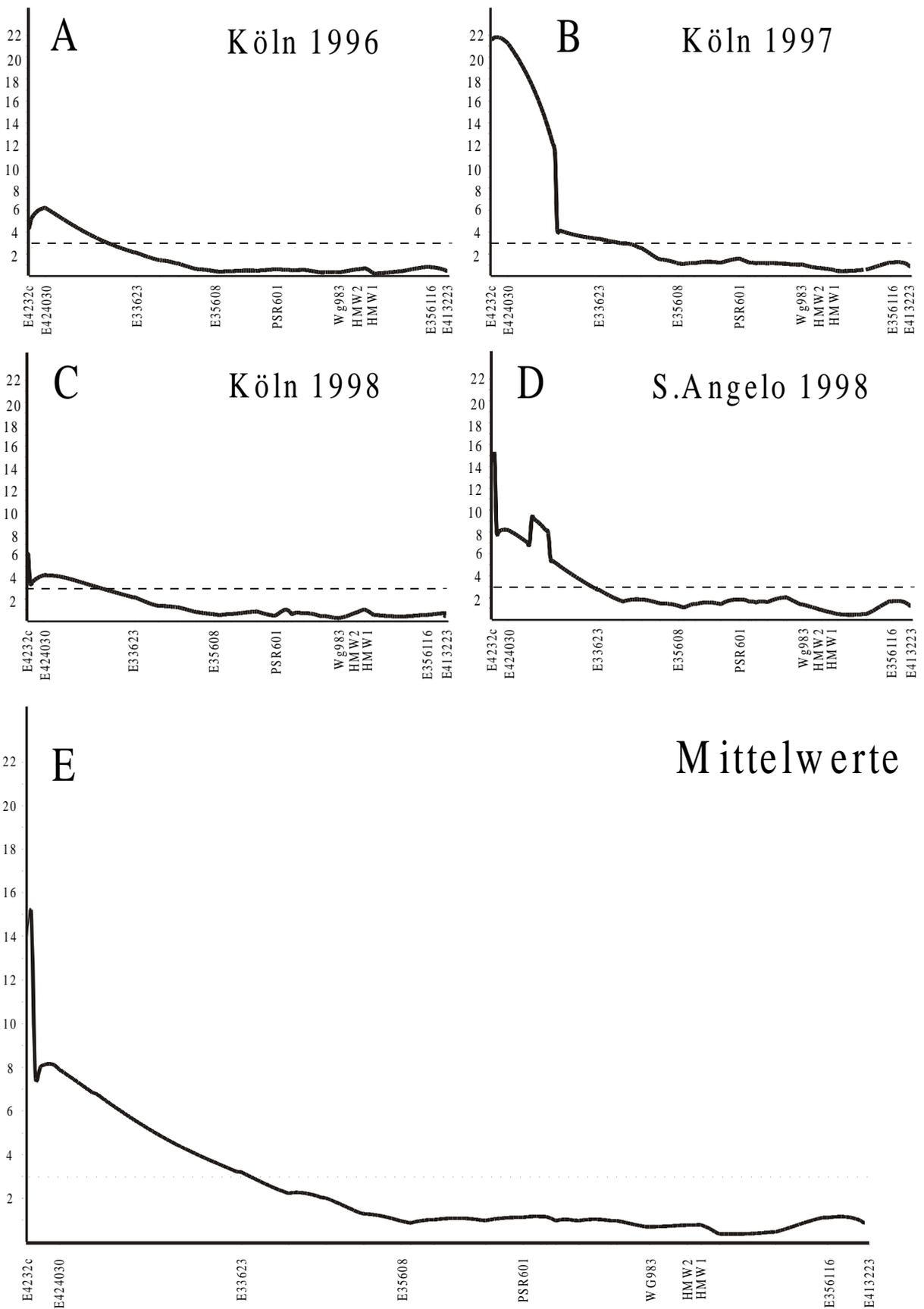


Abb.:15 Analyse der Backqualität durch Intervallkartierung auf Chromosom 1. Es sind die LOD-Kurven (vertikale Achse) der Backqualität entlang des Chromosoms (horizontale Achse) in Köln in den Jahren 1996 (A), 1997 (B) und 1998 (C), sowie S.Angelo (D) dargestellt. In E ist die LOD-Kurve der Intervallanalyse der gemittelten Backqualitätsdaten aufgezeigt. Die horizontale Achse ist mit einer Auswahl kartierter Marker beschriftet.

Tab.10: Positionen der QTLs auf den Chromosomen 1,3 und 5b. (1) Position des QTL = centi Morgan Abstand des QTLs vom Anfang des Chromosoms. (2) LOD-Wert = Logarithmus des Quotienten der Wahrscheinlichkeit, mit der der QTL auf dieser Position kartiert und der Wahrscheinlichkeit, daß er dort nicht kartiert. (3) CI = Konfidenzintervall, centi Morgan-Distanz, in der der LOD-Wert zu beiden Seiten des Maximums um den Wert eins fällt. Offene CIs, deren eines Ende vom Ende des Chromosoms begrenzt werden, sind mit \* gekennzeichnet

	Chrom1	Chrom3			Chrom5a	
<b>Köln 1996</b>						
Pos. des QTL (1)	35		141			6
LOD Wert (2)	6,2		5,7			3,3
CI (cM) (3)	11		7			24*
<b>Köln 1997</b>						
Pos. des QTL (1)	31		166			6
LOD Wert (2)	21,8		6,6			10,4
CI (cM) (3)	7*		4*			11*
<b>Köln 1998</b>						
Pos. des QTL (1)	29	131	141	166		8
LOD Wert (2)	6,1	10,8	10,8	11,1		3,1
CI (cM) (3)	<1	6	7	2*		16*
<b>S.Angelo 1998</b>						
Pos. des QTL (1)	30	141		166	0	86
LOD Wert (2)	15,0	3,7		4,4	3,8	3,0
CI (cM) (3)	<1	8		2*	15*	27
<b>Mittelwerte</b>						
Pos. des QTL (1)	30	141		166		6
LOD Wert (2)	15,4	7,6		7,2		4,6
CI (cM) (3)	<1	11		3*		20*

### 3.3.2.2 QTL auf Chromosom 3

Auch auf Chromosom 3 konnte in allen drei Jahren und an beiden Standorten ein QTL detektiert werden. Dieser liegt im Bereich der Marker E355910 und E366210. Je nach Jahr und Standort sind LOD-Werte und Position zum Teil verschoben (Abb.15). Die LOD-Kurve zeigt mehrere Zwischenmaxima und einen Anstieg zum Ende des Chromosoms hin, was auf einen möglichen weiteren QTL hindeutet.

Bei den gemittelten Backqualitätswerten kartieren QTLs auf den Positionen 141 und 166 mit einem LOD-Wert von 7,6 bzw. 7,2. Das Konfidenzintervall vom Maximum auf Position 141 hat eine Länge von 11 cM, während das Konfidenzintervall des zweiten Maximums 3 cM lang ist und offen endet.

### 3.3.2.3 QTL auf Chromosom 5

Der dritte QTL dieser Analyse wurde mit Wahrscheinlichkeiten zwischen LOD 3,1 und LOD 10,4 auf Chromosom 5 lokalisiert. In Köln kartiert er in allen drei Jahren im Intervall zwischen E32609 und E424034 auf Position 6 bzw. 8. Das Maximum der LOD-Kurve von S. Angelo 1998 liegt genau am ersten Marker von Chromosom 5 auf Position 0 mit einem Wert von LOD 3,8.

Zusätzlich zu diesem QTL konnte in S. Angelo 1998 ein weiterer QTL auf Chromosom 5 im Intervall zwischen den Markern E423838 und E326012 lokalisiert werden. Dieser liegt mit einer Wahrscheinlichkeit von LOD 3,0 auf Position 86 (Abb.16 D, Tab.10). In Köln konnte dieser QTL nicht mit einem LOD-Wert über 3,0 lokalisiert werden, jedoch zeigen die LOD-Kurven in allen drei Jahren eine mehr oder weniger starke Zunahme in diesem Bereich (Abb.16 A-C).

Die QTL-Analyse der Mittelwerte gibt einen QTL ebenfalls auf Position 6 an. Dieser kartiert dort mit einer Wahrscheinlichkeit von LOD 4,6 in einem Konfidenzintervall von 20 cM. Auch dieses Konfidenzintervall endet offen (Abb.16 E).

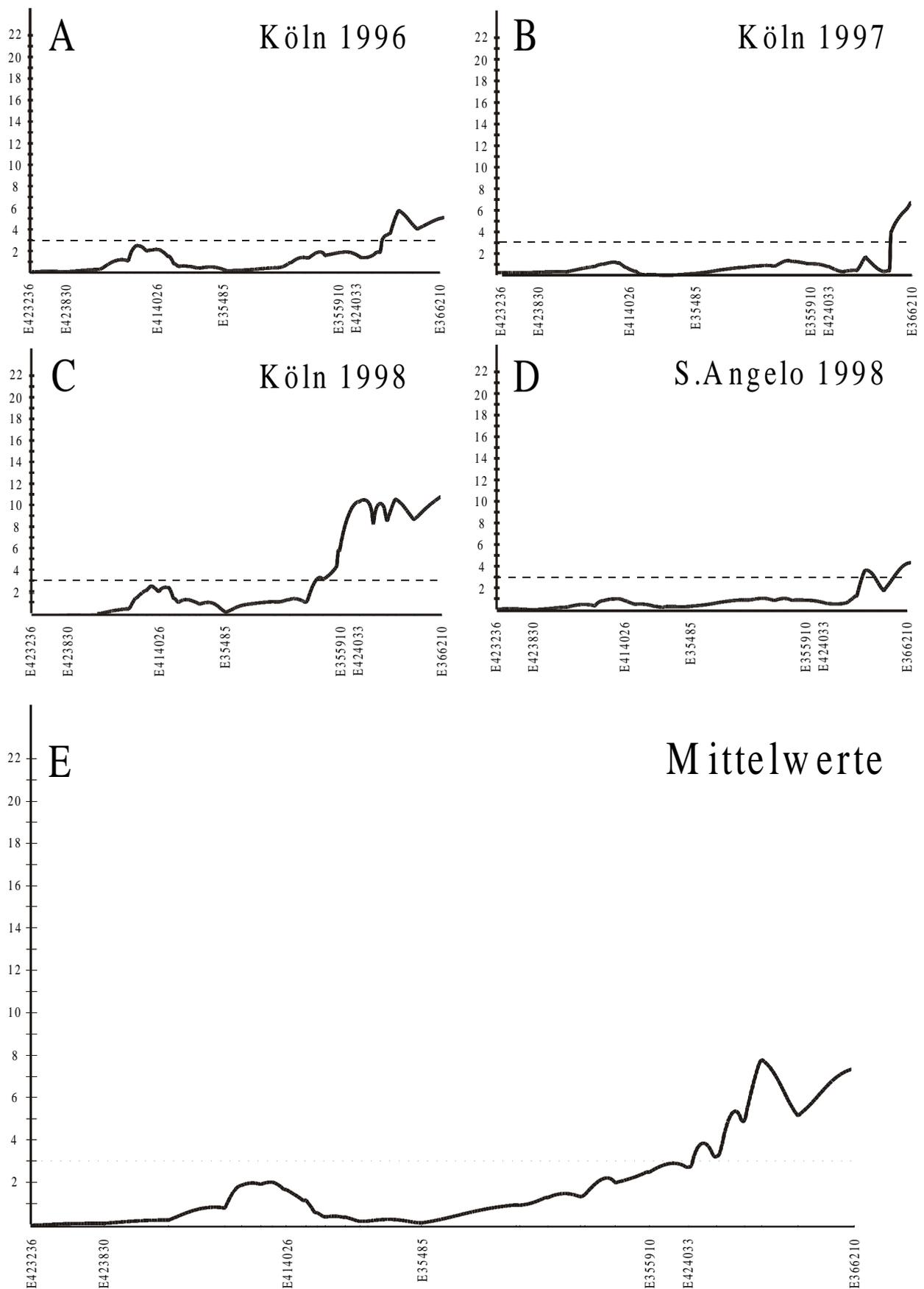


Abb.:15 Analyse der Backqualität durch Intervallkartierung auf Chromosom 3. Es sind die LOD-Kurven (vertikale Achse) der Backqualität entlang des Chromosoms (horizontale Achse) in Köln in den Jahren 1996 (A), 1997 (B) und 1998 (C), sowie S.Angelo (D) dargestellt. In E ist die LOD-Kurve der Intervallanalyse der gemittelten Backqualitätsdaten aufgezeigt. Die horizontale Achse ist mit einer Auswahl kartierter Marker beschriftet.

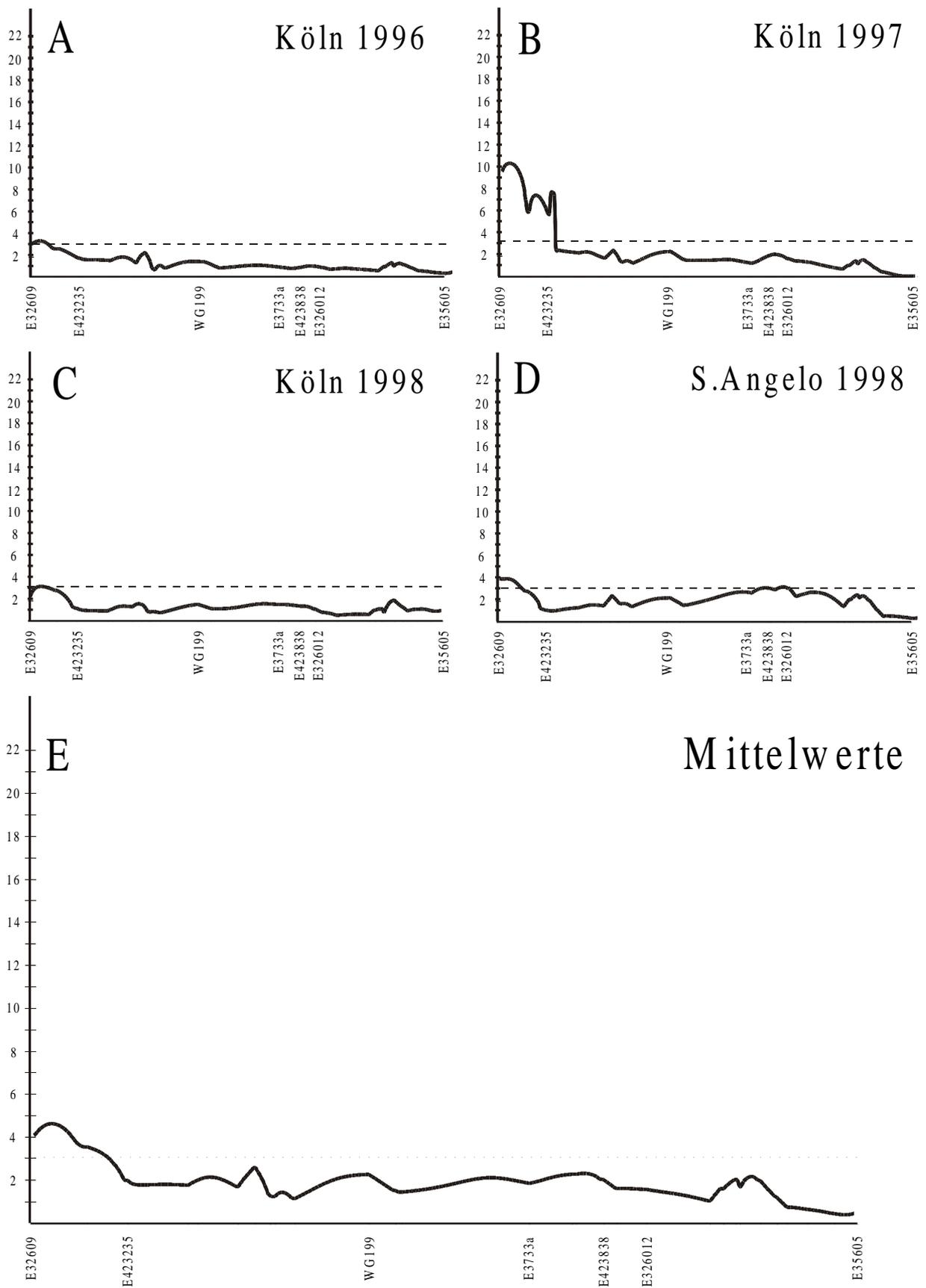


Abb.:16 Analyse der Backqualität durch Intervallkartierung auf Chromosom 5. Es sind die LOD-Kurven (vertikale Achse) der Backqualität entlang des Chromosoms (horizontale Achse) in Köln in den Jahren 1996 (A), 1997 (B) und 1998 (C), sowie S. Angelo (D) dargestellt. In E ist die LOD-Kurve der Intervallanalyse der gemittelten Backqualitätsdaten aufgezeigt. Die horizontale Achse ist mit einer Auswahl kartierter Marker beschriftet.

### 3.4 Kartierung der Gluteninallele

Um einen Einfluß der Glutenine auf die Backqualität überprüfen zu können, wurden die Allele der Einkornglutenine analysiert und auf den Genkarten kartiert. Für die Kartierung der Proteinallele wurde eine saure Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt, die acht polymorphe Banden ergab (Abb.17). Zwei Banden wurden aufgrund ihres hohen Molekulargewichtes als "High Molecular Weight Glutenins" (HMW-GS 1 und 2) bezeichnet, die Banden 3-8 als "Low Molecular Weight Glutenins" (LMW-GS 3-8). Für jede F<sub>2</sub>-Pflanze der Qualitätspopulation wurde das Proteinbandenmuster analysiert und entsprechend den molekularen Daten für JoinMap zugänglich gemacht.

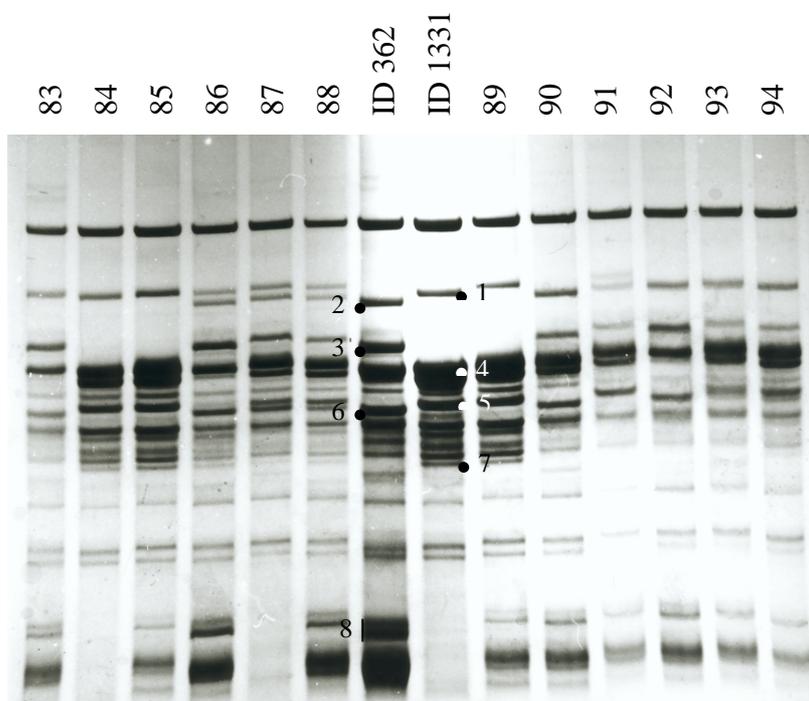


Abb.17: A-PAGE Analyse der Glutenine der F<sub>2</sub>-Nachkommen Nr. 83-94 und der Eltern ID 362 und ID 1331 der Qualitätskreuzung. Die polymorphen Banden sind markiert und numeriert. Die Banden 1 und 2 entsprechen den HMW-GS 1 und 2, die Banden 3-8 den LMW-GS 3-8.

Die Kartierung der Proteinallele ergab eine Lokalisierung der beiden HMW-GS 1 und 2 auf Chromosom 1 in der Untergruppe 8 (Abb.18, Tab.11). Die LMW-GS 3-7 konnten bei den verwendeten Schwellenwerten nicht auf

der Genkarte kartiert werden, koppeln jedoch bei Nichtbeachtung des Jump-Wertes in der Untergruppe 4

Tab.11:  
Positionen der HMW-GS- und LMW-GS-Banden 1-8 auf den Chromosomen 1 und 6 (siehe auch Abb.17 und 18)

	Glutenin Bande	Kopplungsgruppe	Untergruppe
HMW	1	1 (a)	8
	2	1 (a)	8
LMW	3	1 (b)	4
	4	1 (b)	4
	5	1 (b)	4
	6	1 (b)	4
	7	6 (b)	86

a = kartiert auf einem spezifischen Locus in der gegebenen Untergruppe  
b = kartiert ohne präzise Locus Position innerhalb einer spezifischen Untergruppe

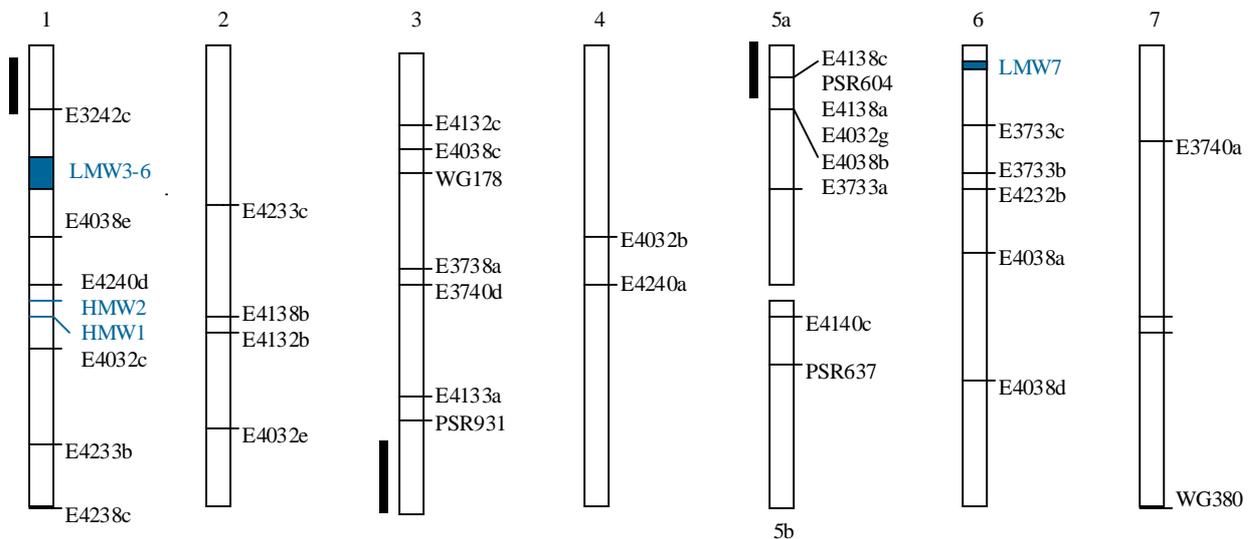


Abb.18: Schematische Darstellung der Positionen der HMW-GS 1-2 und der LMW-GS 3-7. Die beiden HMW-GS 1 und 2 konnten auf der Karte einem eindeutigen Locus zugewiesen werden. Die LMW-GS 3-7 koppelten zwar eindeutig mit den Kopplungsgruppen für Chromosom 1, bzw. 6, bei der Berechnung ihrer genauen Positionen im Genom konnten sie bei den verwendeten Schwellenwerten jedoch nicht kartiert werden. Bei Nichtbeachtung des Jump-Wertes ließen sie sich aber zumindest einer Chromosomenregion zuordnen. Diese Regionen sind an den entsprechenden Positionen auf dem Chromosom farbig markiert.

von Chromosom 1 bzw. Untergruppe 86 von Chromosom 6. Die LMW-GS Bande 8 konnte keiner Kopplungsgruppe zugeordnet werden. Die hier dargestellten Ergebnisse deuten auf einen Einfluß der LMW-GS 3-7 auf die Backqualität hin, der durch die Korrelation des QTLs auf Chromosom 1 und der Position der LMW-GS angezeigt wird. In Abbildung 19 ist eine detaillierte Analyse des QTL 1 dargestellt.

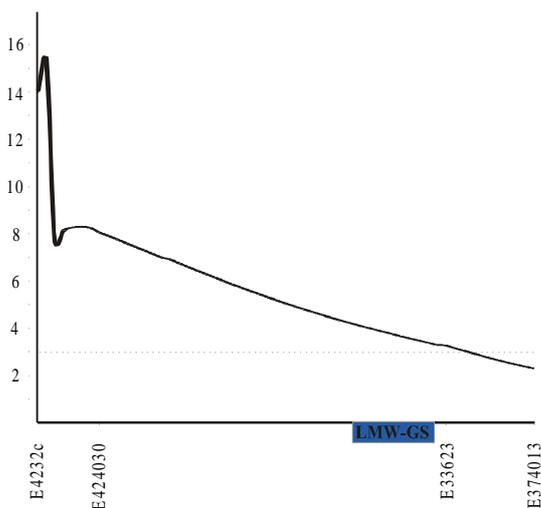


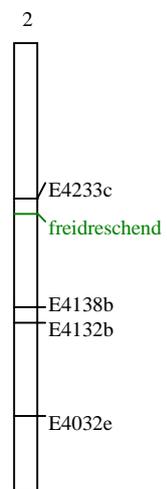
Abb.19: LOD-Kurve des QTLs auf Chromosom 1, berechnet anhand der Mittelwerte der Backqualitätsanalyse aus allen drei Jahren der Standorte Köln und S.Angelo und die Positionen der Speicherproteine des Einkornweizens. Die Region von Chromosom 1, mit der die HMW-GS 3-7 koppeln ist farbig unterlegt

### 3.5 Kartierung des Merkmals "freidreschend"

Ein weiterer Schritt hin auf eine zukünftige, kommerzielle Nutzung des Einkornweizens ist die Lokalisierung des Merkmals "freidreschend". Die Analyse des Merkmals wurde an den Nachkommen der Kartierungskreuzung, die für dieses Merkmal polymorph sind, durchgeführt. Von den 127 Nachkommen zeigten 94 eine Verwachsung der äußeren, doppelt gekielten Hüllspelze mit dem Korn, 32 Individuen waren freidreschend, ein F<sub>2</sub>-Nachkomme war ausgefallen. Das Vererbungsmuster zeigt die typische 3:1-Spaltung eines monoallelischen, dominant-rezessiven Merkmals, wobei das Merkmal der Verwachsung über das Merkmal "freidreschend" dominiert.

Die morphologischen Daten wurden anschließend in ein für JoinMap lesbares Format gebracht und das Merkmal "freidreschend" auf dem Einkornchromosom 2 lokalisiert (Abb.20). Damit ist es für eine markerunterstützte Selektion oder mögliche "Map Based Cloning"-Ansätze zugänglich.

Abb.20: Schematische Darstellung des Einkornchromosoms 2 mit dem Locus für das Merkmal "freidreschend"



## 4. Diskussion

Der Einkornweizen *T. monococcum* ist aufgrund seiner guten ernährungsphysiologischen Eigenschaften, wie z.B. der hohe Carotin- und Proteingehalt, seiner Verträglichkeit für Zöliakiekranken und wegen seiner geringen Nährstoffansprüche in den letzten Jahren wieder mehr in den Mittelpunkt des Interesses gerückt. Es wurden zahlreiche Aktivitäten unternommen, um aus *T. monococcum* ein neues Getreide für den europäischen Markt zu machen, das Rohmaterial für die Nahrungsmittelindustrie und spezielle Diäten für Zöliakiekranken liefert.

Für eine Etablierung des Einkornweizens als "low input"-Getreide wurden die bestehenden genetischen Ressourcen in einer großen Keimplasma-Kollektion von 1393 Einkorn-Linien gesammelt und im Hinblick auf ihr Potential für eine kommerzielle Nutzung hin charakterisiert (Castagna *et al.* 1995b). Neben der Bestimmung der Verwandtschaftsbeziehungen der Linien innerhalb der Kollektion (Castagna *et al.* 1994) und dem Entwurf eines Entwicklungsmodells von *T. monococcum* (Castagna 1992, Castagna *et al.* 1993) wurden sowohl agronomische Merkmale, wie z.B. der Ertrag, die Pflanzhöhe und die Lagerresistenz (Empilli *et al.* 1995, Castagna *et al.* 1995a), als auch die Variabilität für die Backqualität auf der morphologischen Ebene bestimmt (Empilli *et al.* 1995, Borghi *et al.* 1996). Es wurde ein Kreuzungsprogramm gestartet, um wichtige agronomische Merkmale zu evaluieren und für eine gezielte Züchtung zugänglich zu machen. Die Identifizierung der auf die Backqualität einflussnehmenden QTLs ist ein weiterer Schritt hin auf die Etablierung von *T. monococcum* als kommerzielles Getreide.

### 4.1 Genkarten der sieben Einkornchromosomen

Das Merkmal Backqualität wurde in dieser Arbeit näher analysiert und es wurde versucht sowohl die für die Backqualität relevanten QTLs zu identifizieren, als auch den Einfluss bestimmter Gluteninallele zu überprüfen. Die dafür benötigte Genkarte von *T. monococcum* wurde mit AFLP- und RFLP-Markern erstellt und deckt eine Genomgröße von 1066 cM ab. Die berechneten Chromosomen umfassen eine Länge von 47-177cM (Tab. 7, Abb.9). Chromosom 7 ist mit 47cM das kürzeste Chromosom, gefolgt von Chromosom 4 mit 129cM. Während die berechneten Karten der Chromosomen 1 bis 6 gut mit den Ergebnissen aus anderen Kartierungsexperimenten übereinstimmen (Kojima *et al.* 1998; Dubcovsky *et al.* 1996; Nelson *et al.* 1995), steht die Länge von Chromosom 7 im Gegensatz zu diesen. In den Arbeiten von Kojima *et al.* (1998), Dubcovsky *et al.* (1996) und Nelson *et al.* (1995c) zeigt das Chromosom 7 im Vergleich mit den anderen sechs Einkornchromosomen mittlere bis sehr große Längen. Das Chromosom 7 von Nelson *et al.* (1995c) ist mit 240 cM fast doppelt so groß, wie die

Chromosomen 4 und 5 (beide 145cM). Die für diese Analyse verwendeten genomischen RFLP-Marker, die eine Abdeckung des gesamten Genoms ermöglichen sollten, haben jedoch schon in anderen Untersuchungen von Becker *et al.* (1995) und Heun *et al.* (1991) eine ungleichmäßige Verteilung über das Genom gezeigt, was zu einer Falscheinschätzung der Chromosomenlänge geführt hat.

Es zeigen jedoch auch die Ergebnisse der Untersuchungen von Kojima *et al.* (1998) und Dubcovsky *et al.* (1996) größere Chromosomenlängen für das Chromosom 7 im Vergleich mit den anderen sechs Chromosomen. Die durch die Genomanalyse mit ISSR- und RAPD-Markern bzw. RFLP-Markern, Isoenzym- und Speicherprotein-Analyse erhaltenen Chromosomenlängen von 127,7 bzw. 146cM liegen im mittleren Bereich und können wegen einer guten Korrelation mit Ergebnissen aus anderen Untersuchungen (Dubcovsky *et al.* 1996, Nagaoka und Ogihara 1997, Gale *et al.* 1995) als gesichert angesehen werden. Der Grund für die hier berechnete geringe Chromosomenlänge ist ungeklärt und läßt sich eventuell mit einer schlechten Kopplung der hier gewählten AFLP-Marker mit Chromosom 7 erklären.

Das Chromosom 5 ist in dieser Arbeit aufgrund fehlender molekularer Daten in zwei Gruppen unterteilt, von denen die Zuordnung der einen Gruppe nicht ganz eindeutig ist. Mit dieser Gruppe koppeln die beiden RFLP-Marker WG199 und PSR604. Der Marker WG199 kartiert sowohl bei Dubcovsky *et al.* (1996), als auch bei Devos *et al.* (1995) auf dem Einkornchromosom 5. Bei dem Marker PSR604 gibt es voneinander abweichende Angaben.

Devos *et al.* (1993) hat PSR604 auf dem Gerstenchromosom 4R, das zum Großteil dem Weizenchromosom 4 entspricht, lokalisiert. Der Locus von PSR604 auf der Gerste liegt bei Devos *et al.* (1993), zusammen mit PSR1 auf dem langen Arm des Chromosoms, ca. 15cM von der Region des Centromers entfernt. Diese beiden Marker wurden jedoch bei LOD-Werten < 2,5 kartiert und befinden sich damit nicht in standardmäßig gesicherten Bereichen. Devos *et al.* (1995) kartieren in späteren Untersuchungen den Marker PSR1 am Ende des langen Armes auf dem Einkornchromosom 5.

Nimmt man die Kopplung der Marker PSR1 und PSR604 als richtig an, so ist die Kartierung von PSR604 auf dem Gerstenchromosom 4R in der Nähe der Centromer-Region wahrscheinlich verschoben und der Marker kartiert eher in der Region 4R, der von einer Translokation der Chromosomenarme 4AL und 5AL des Weizengenoms, die durch zahlreichen Untersuchungen bestätigt wurde (Naranjo *et al.* 1987; Devos *et al.* 1993, 1995; Dubcovsky *et al.* 1996; Anderson *et al.* 1992) betroffen ist. Damit ist die Zuordnung der hier berechneten Kopplungsgruppe zum

Einkornchromosom 5 durch den Marker PSR604, zusammen mit der Information des Markers WG199 möglich.

Unterstützt wird diese Annahme durch einen Vergleich der Längenverhältnisse der Chromosomen in dieser Arbeit und der in den Untersuchungen von Dubcovsky *et al.* (1996), Kojima *et al.* (1998) und Qi *et al.* (1996). Nur bei einer Zuordnung der fraglichen Kopplungsgruppe zum Chromosom 5 und nicht zum Chromosom 4 stimmen die Längenverhältnisse der beiden Chromosomen in allen vier Untersuchungen überein. Die Kopplungsgruppe mit den RFLP-Markern WG199 und PSR604 wird aufgrund der hier dargestellten und diskutierten Ergebnisse als Chromosom 5a bezeichnet und dargestellt.

Bei zwei RFLP-Sonden kommt es zur Kartierung auf Chromosomen, die laut Angaben aus anderen Kartierungsexperimenten mit Weizen oder Gerste auf anderen Chromosomen lokalisiert sein sollen. PSR128 kartiert hier auf Chromosom 1S, ist aber laut Gill *et al.* (1996) und Kojima *et al.* (1998) auf Chromosom 5L lokalisiert. Da die Locusangaben von Experimenten mit *T. aestivum* stammen und PSR128 auf *T. monococcum* mit hoher Wahrscheinlichkeit kartiert, kann diese Diskrepanz lediglich durch Translokationen des fraglichen Locus im Laufe der Evolution erklärt werden.

Eine weitere Abweichung von den bisher kartierten Ergebnissen ist auf Chromosom 4 zu finden. Dort kartiert der RFLP-Marker WG282, der nach Untersuchungen von Heun *et al.* (1991) in der Mitte von Chromosom 6 lokalisiert ist, 52cM bzw. 77cM von den beiden Chromosomenenden entfernt. Die Tatsache, daß die molekularen Daten für diesen Marker hier lediglich aus einer Untergruppe der Kartierungspopulation mit 50 Individuen erhalten wurden und der Signifikanzwert der molekularen Daten unter 5% liegt, läßt auf eine falsche Kartierung dieses Markers schließen.

Die hier berechnete Gesamtgenomgröße (1066cM) stimmt gut mit den Ergebnissen von Dubcovsky *et al.* (1996) mit 1067cM und Kojima *et al.* (1998) mit 862,2cM überein und läßt auf eine gute Abdeckung des gesamten Genoms schließen. Kojima *et al.* (1998) kommt auf eine etwas kürzere Gesamtgenomlänge, die aber dadurch erklärt wird, daß lediglich neun bis achtzehn Marker pro Chromosom vorhanden sind. Es ist anzunehmen, daß dadurch bei dieser Untersuchung keine Abdeckung des gesamten Genoms erreicht wurde. Ebenfalls ganz ähnliche Ergebnisse liefert die integrierte Gersten-Karte von Qi *et al.* (1996) aus vier Komponentenkarten. Die berechnete Gesamtlänge von 1060cM zeigt eine gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Dubcovsky *et al.* (1996) und dieser Arbeit und bestätigt damit die Kolinearität

nicht nur zwischen *T. aestivum* und *T. monococcum* (Marino *et al.* 1996), sondern auch zwischen den beiden Spezies Gerste und Weizen.

Das hier verwendete Programm JoinMap wurde auch von Qi *et al.* (1996) für die Erstellung der integrierten Gerstenkarten genutzt. Bei einem Vergleich der einzelnen Komponentenkarten, die sowohl mit MAPMAKER, als auch mit JoinMap berechnet wurden, stellte sich heraus, daß JoinMap im Vergleich mit MAPMAKER geringfügig kürzere Karten produziert, ansonsten aber eine gute Übereinstimmung in der Berechnung der Markerdistanz und –reihenfolge zu finden war. Die kürzere Karte bei der Berechnung mit JoinMap entsteht bei Interferenz zwischen den Markern. JoinMap bezieht diese mit in die Berechnung ein, MAPMAKER nicht. Dadurch entstehen geringfügig kürzere Karten bei gleicher Markerinformation (Stam, 1993).

Kleine Unterschiede in der Markerdistanz zwischen JoinMap- und MAPMAKER-Karten konnten auch Mangin *et al.* (1999) bei der Berechnung einer genetischen Karte der Tomate feststellen. Die Karten erwiesen sich jedoch für die Lokalisierung von QTL als gleichgut geeignet und lassen damit eine Entscheidung für das ein oder andere Programm offen. Generell ist jedoch eine mit JoinMap berechnete, integrierte Karte aus Ergebnissen mehrerer Kartierungsexperimente aufgrund der höheren Markerdichte und damit einer sichereren Kartierung jedes einzelnen Markers (Qi *et al.* 1996) einer mit MAPMAKER berechneten einzelnen Komponentenkarte aus nur einem Kartierungsexperiment für eine QTL-Kartierung vorzuziehen (Tanksley *et al.* 1992).

#### 4.2 QTL für die Backqualität

Merkmale, die in ihrem Vererbungsschema stark von der erwarteten 1:2:1-Spaltung beim intermediären, bzw von der 3:1-Spaltung beim dominant-rezessiven Erbgang abweichen und deren Vererbung kontinuierlich ist, werden als quantitative Merkmale bezeichnet. Eine Analyse des Merkmals Backqualität im Einkornweizen zeigt diese kontinuierliche Verteilung (Abb.11) und läßt darauf schließen, daß die genetische Kontrolle der Backqualität komplex ist und es sich damit um ein quantitatives Merkmal handelt. Eine Vielzahl von Faktoren konnte in bisherigen Untersuchungen gefunden werden, die einen Einfluß auf die Backqualität haben. Dazu gehört vor allem die Prolaminzusammensetzung (Gupta *et al.* 1989; Corbellini *et al.* 1999), aber auch der Fettsäuregehalt des Mehls (Conforti *et al.* 1993; Mac Ritchie 1981), die Stärkestruktur (Soulaka und Morrison 1985) und Enzymaktivitäten (Every *et al.* 1996).

Für eine genaue Analyse der Ursachen für die Backqualität mit eventueller Identifizierung und Verifizierung von Kandidatengenen wurde eine QTL-Analyse durchgeführt. Die für die Berechnung verwendeten Markerrahmen zeigen mit einem durchschnittlichen Markerabstand von 3,48 cM eine ausreichend dichte Abdeckung des Genoms. Es konnten drei relevante QTL auf den Chromosomen 1, 3 und 5a identifiziert werden, deren LOD-Kurven in allen drei Jahren und beiden Standorten eine hohe Reproduzierbarkeit zeigen.

#### *QTL auf Chromosom 1*

Der QTL auf Chromosom 1 wird in allen drei Jahren und beiden Standorten im Intervall zwischen den Markern E4232c und E424030 detektiert. Der LOD-Wert schwankt zwischen 6,1 und 21,8 und liegt damit deutlich über dem hier gewählten Schwellenwert von LOD 3,0. Damit läßt sich auf Chromosom 1 ein QTL mit großer Sicherheit annehmen. Im Jahr 1998 zeigt der Kurvenverlauf der LOD-Kurve mehrere Maxima die das mögliche Vorhandensein eines weiteren QTL anzeigen (Abb.14).

Das Intervallkartierungsverfahren von Lander und Botstein (1989) geht von einem Ein-QTL-Modell aus, das gekoppelte QTLs auf einem Chromosom lediglich in Abhängigkeit von Markerdichte und Anzahl Nachkommen unterscheiden kann (Lebreton, 1998). Bei der Anwesenheit zweier QTL kann es durch eine gegenseitige Beeinflussung zu einer Verschiebung oder Überlagerung der wahren Loci kommen, die bei der Intervallkartierung durch eine fehlende Berücksichtigung der außerhalb des aktuellen Intervalls liegenden QTLs verursacht wird (Zeng, 1994; Haley und Knott, 1992). Da zwischen den beiden Markern E424030 und E33623 eine Distanz von 38,4cM (Abb.12) liegt, kann man davon ausgehen, daß es sich bei dem auf Chromosom 1 identifizierten QTL in Wahrheit um zwei gekoppelte QTLs handelt, die durch das Intervallkartierungsverfahren nicht voneinander unterschieden werden können.

Für die Klärung der Frage, ob es sich bei den hier berechneten QTLs tatsächlich um zwei Loci handelt, müßte eine weitere molekulare Analyse durchgeführt werden, um zusätzliche Marker in dem Intervall auf Chromosom 1 zu kartieren. Durch eine Trennung der beiden möglichen QTLs in zwei separaten Intervalle und eine QTL-Analyse mit einem Programm, das die Möglichkeit hat, mehrere gekoppelte QTLs voneinander zu unterscheiden, könnte die Vermutung über die Anwesenheit zweier QTLs bestätigt oder widerlegt werden.

#### *QTL auf Chromosom 3*

Der QTL auf Chromosom 3 kartiert mit hoher Reproduzierbarkeit in allen drei Jahren und beiden Standorten zwischen Position 141 und 166 (Tab.10, Abb.15). Der QTL liegt am Ende des Chromosoms meist in einem offenen Konfidenzintervall und läßt damit eine Aussage über

eine genaue Position nicht zu. Der QTL liegt am Chromosomenende oder dahinter in einem Bereich, der noch nicht von Markern abgedeckt wird (Hyne, 1995). In Köln zeigt die Wahrscheinlichkeitskurve drei Maxima auf den Positionen 131, 141 und 166, in S. Angelo zwei auf Position 141 und 166, wobei der Peak auf Position 166 in einem offenen Konfidenzintervall liegt. Ob es sich bei dem einen, bzw. zwei vorgelagerten Maxima um einen bzw. mehrere gekoppelte QTLs handelt, oder um Artefakte, die bedingt durch die Bestimmungsschwierigkeiten eines QTLs am Chromosomenende entstanden sind, konnte auch hier durch die Intervallanalyse nicht bestimmt werden und bedarf weiterer Aufklärung.

#### *QTL auf Chromosom 5*

Manche QTLs lassen sich nur unter bestimmten Klima- oder Anbau-Bedingungen lokalisieren, was auf eine umweltabhängige Aktivierung verschiedener Gene schließen läßt. Diese umweltabhängige Genaktivierung zeigt sich in einer QTL-Verschiebung entlang des Genoms (Toojinda *et al.* 1998, Iyamabo und Hayes 1995, Mangin *et al.* 1999), die hier auf Chromosom 5 bei der QTL-Analyse mit den Daten des Jahres 1998 in S. Angelo beobachtet werden konnte (Tab.10, Abb.16). Mit Ausnahme der Daten aus S. Angelo 1998, kartiert der dort detektierte QTL konstant auf Position 6 oder 8 mit einer Wahrscheinlichkeit zwischen LOD 3,1 und 10,4. In S. Angelo konnte ein weiterer QTL mit LOD 3,0 auf Position 86, also 80cM vom ersten QTL entfernt lokalisiert werden. Dieser zweite QTL verursacht offenbar eine Verschiebung des ersten QTL auf Position 0. Der QTL auf Position 86 ist wahrscheinlich ein QTL mit einem geringeren Einfluß auf das Merkmal, der nur unter den Bedingungen des Standortes S. Angelo, Italien auftritt. Zwar ist die Wahrscheinlichkeitskurve 1997 in Köln an dieser Position auf den Wert LOD 2,0 erhöht, bei diesem Wert ist aber die Möglichkeit zum Vorhandensein falscher Positiver zu groß und der QTL läßt sich dort nicht mit Sicherheit lokalisieren.

### 4.3 Korrelation der QTLs für die Backqualität mit möglichen Kandidatengen

#### *QTL auf Chromosom 1*

Bisherige Untersuchungen der Ursachen für die Backqualität haben sich auf eine physiologische Analyse der Bestandteile und Zusammensetzungen des Mehl beschränkt. Neben dem Fettsäuregehalt (Soulaka und Morrison, 1985) und der Stärkestruktur (Conforti *et al.* 1993) wurde vor allem ein Einfluß der Glutenine, die von den Loci Glu-1 und Glu-3 auf dem langen, bzw. kurzen Arm von Chromosom 1 kodiert werden, für die variierende Backqualität verantwortlich gemacht (Gupta *et al.* 1989; Saponaro *et al.* 1995; Corbellini *et al.* 1999). Die Lokalisierung dieser Allele auf der Genkarte ermöglichte eine Überprüfung der Korrelation mit den QTLs für die Backqualität.

Die Glutenine, die mit der in Abbildung 19 markierten Region in der integrierten Karte koppeln, konnten aufgrund unzureichender molekularer Daten keinem eindeutigen Locus zugeordnet werden und müssen noch mit Hilfe weiterer Untersuchungen abgesichert werden. Die hier vorhandenen Daten sind jedoch ausreichend, um die kodierende Region in diesem Bereich festzulegen. Bei Annahme des Vorhandenseins zweier QTLs auf Chromosom 1 auf der identifizierten Position und der damit verbundenen Verschiebung des zweiten QTLs zum distalen Ende des Chromosoms hin, ist eine gute Korrelation zwischen diesem QTL und den auf Chromosom 1 lokalisierten LMW-GS gegeben (Abb. 19). Der Einfluß der LMW-GS auf die Backqualität von Einkornweizen, der bisher nur auf physiologischer Basis nachgewiesen werden konnte (Payne *et al.* 1987; Gupta *et al.* 1989, 1994; Saponaro *et al.* 1995; Corbellini *et al.* 1999), ist damit auf molekularer Ebene bestätigt.

Anhand der Ergebnisse der hier durchgeführten QTL-Analyse war eine Unterscheidung des Einflusses der LMW-GS (kodiert vom Locus Glu-3) und dem der Gliadine (kodiert vom gekoppelten Locus Gli-1) nicht möglich. Die eventuelle Anwesenheit von zwei gekoppelten QTLs auf Chromosom 1 läßt jedoch einen Einfluß der Gliadine auf die Backqualität vermuten, was durch eine Kartierung der Gliadinallele auf der Genkarte von *T. monococcum* und eine detaillierte Genotypisierung in diesem Intervall bestätigt werden muß.

Neben den LMW-GS ist vor allem aber auch ein Einfluß der HMW-GS, die vom Locus Glu-1 in der Untergruppe 8 auf Chromosom 1 kodiert werden, auf die Backqualität bekannt (Gupta *et al.* 1994, Sontag-Strohm *et al.* 1996, Gupta *et al.* 1989, Saponaro *et al.* 1995). Durch die hier durchgeführte QTL-Analyse konnte jedoch, wenn überhaupt, dann nur ein geringer Einfluß der HMW-GS auf die Backqualität festgestellt werden. Dem widersprechende Ergebnisse basieren alle auf physiologischen Untersuchungen, bei denen sich eine Unterscheidung des Einflusses der HMW- und LMW-GS immer als schwierig erwiesen hat und damit die Möglichkeit besteht, daß der Einfluß der HMW-GS auf die Backqualität bisher immer überschätzt wurde. Letztendliche Klärung der Frage des Einflusses der HMW-GS könnte eine detaillierte Analyse der HMW-GS-Allele und ihre Kartierung bringen, um damit auszuschließen, daß die hier deutlich gewordenen Ergebnisse nicht durch eine Akkumulation negativer HMW-GS-Allele verursacht wurde.

#### *QTLs auf Chromosomen 3 und 5*

Für die QTLs auf den Chromosomen 3 und 5 wurden in dieser Arbeit keine Kandidatengene gesucht. Bekannt ist jedoch, daß diese Loci keine Speicherproteine kodieren. Eventuell liegen hier Gene, die für den Fettsäurestoffwechsel, oder die Stärke-Synthese verantwortlich sind. Sie könnten einen zwar geringen, aber doch konstanten und eindeutigen Einfluß auf die Backquali-

tät ausüben und damit die Ergebnisse von Conforti *et al.* (1993), Mac Ritchie (1981) und Soulaka und Morrison (1985) bestätigen. Möglicherweise liegt dort aber auch ein Faktor, der bisher noch nicht bei der Backqualitätsbestimmung in Erwägung gezogen worden ist. Eine weitere Eingrenzung des interessanten Intervalls und nähere Aufklärung der Kandidatengene ist in jedem Fall sinnvoll.

#### 4.4 Kartierung des Merkmals "freidreschend"

Der Einkornweizen *T. monococcum* var. *sinskajae* ist bisher die einzige Spezies seiner Art, die eine weiche, einfach gekielte äußere Hüllspelze besitzt, die sich durch Dreschen vom Korn lösen läßt. Um dieses wichtige Merkmal für eine gezielte Züchtung besser zugänglich zu machen, wurde es an den Nachkommen der Kartierungskreuzung analysiert und auf der Genkarte lokalisiert.

Die typische 3:1-Spaltung des Vererbungsmusters zeigt, daß es sich um ein monoallelisches, dominant-rezessives Merkmal handelt, wobei das Merkmal der Verwachsung, das mit der doppelt gekielten Spelzenform gekoppelt ist, über das Merkmal "freidreschend" dominiert. Das wird von den Ergebnissen von Kuspira *et al.* (1989) bestätigt, die das Merkmal "harte Spelze" (Sg) von allen *T. monococcum* und *T. boeoticum* als dominant über das Merkmal "weiche Spelze" (sg) von *T. monococcum* var. *sinskajae*-Linien gefunden haben. Mit Hilfe von Kopplungsanalysen zwischen einem Vernalisationsgen, das bei *T. aestivum* auf den Gruppe 5 Chromosomen lokalisiert ist, und Sg/sg wurde es in den Untersuchungen von Kuspira *et al.* (1989) auf dem Chromosom 5 von *T. monococcum* lokalisiert.

In dieser Arbeit kartiert das Gen jedoch mit einer Wahrscheinlichkeit von LOD = 6,0 auf Chromosom 2 und widerspricht damit den Ergebnissen von Kuspira *et al.* (1989). Die Tatsache, daß es sich jedoch bei den Untersuchungen von Kuspira *et al.* (1989) um Kopplungsanalysen handelt, die lediglich auf Kopplung zwischen zwei Loci basieren, die Kopplung des morphologischen Merkmals "freidreschend" in dieser Untersuchung mittels molekularer Daten aus der DNA-Analyse selber kartiert wurde und auch von anderen Gruppen eine evolutionäre Verwandtschaft zwischen den Chromosomen 2 und 5 festgestellt worden ist (Nelson *et al.* 1995b, Devos *et al.* 1993, Naranjo, 1990; Liu *et al.* 1992), ist stark anzunehmen, daß das Merkmal tatsächlich auf Chromosom 2 des Einkorngensoms lokalisiert ist. Nicht geklärt werden kann jedoch der Locus des Merkmals auf den drei Genomen des hexaploiden Weizens.

## 5. Zusammenfassung

Die hier dargestellten Ergebnisse tragen zur Klärung der Ursachen für die variierende Backqualität in diploidem Weizen bei und stellen einen weiteren Schritt hin zur kommerziellen Nutzung von *T. monococcum* dar. Aufgrund der Kolinearität zwischen dem A-Genom von *T. aestivum* und dem des Einkornweizens können die Informationen über die QTLs für die Backqualität auf den Brotweizen übertragen und für eine selektive Züchtung genutzt werden.

Die Identifizierung der relevanten QTLs erfolgte in drei Schritten:

1. Erstellung einer Genkarte mittels molekularer Analyse
2. Determinierung der Backqualität mit physiologischen Methoden
3. Lokalisierung der QTLs auf der Genkarte

Die Genkarte wurde aus einer Kombination aus AFLP- und RFLP-Markern mit dichter Abdeckung des Genoms erstellt. Die beiden dafür verwendeten Populationen 1 und 2 wurden aufgrund ihrer Variabilität für das Merkmal Backqualität, bzw. einer erwarteten hohen Polymorphismsrate ausgewählt. Obwohl sich die hohe Polymorphismsrate der Kartierungspopulation nicht bestätigte, wurden die Daten zusammen mit denen der Qualitätspopulation für die Kartenberechnung mit JoinMap verwendet, da die Daten der Qualitätspopulation für eine sichere Genkarte nicht ausreichend waren. Die Kalkulation ergab acht Kopplungsgruppen, welche die sieben Einkornchromosomen representieren. Chromosom 5 wird von zwei Kopplungsgruppen dargestellt. Die abgedeckte Gesamtlänge des Genoms beträgt 1066cM.

Die Determinierung der Backqualität erfolgte über den SDS-Sedimentationsvolumentest. Die dabei deutlich gewordene kontinuierliche Verteilung der Backqualität ist der Hinweis auf ein qualitatives Merkmal.

Zur Lokalisierung der backqualitätsrelevanten QTLs wurden die molekularen und physiologischen Daten kombiniert. Das Ergebniss dieser Analyse waren drei QTLs, die einen Einfluß auf das Merkmal Backqualität haben. Sie sind auf Chromosom 1, 3 und 5 lokalisiert, wobei es sich bei dem Locus auf Chromosom 1 wahrscheinlich um zwei miteinander gekoppelte QTLs handelt.

Zusätzlich zu den hier dargestellten Versuchen wurde eine Analyse der Prolamine der Qualitätspopulation durchgeführt und die Proteinbanden der HMW- und LMW-GS auf der Genkarte lokalisiert. Während die HMW-GS-Banden 1 und 2 sich nicht in der Nähe eines QTLs befinden, koppeln die LMW-GS-Banden 3-6 unter Berücksichtigung der durch einen weiteren

QTL verursachten Verschiebung des QTLs auf Chromosom 1 gut mit diesem und bestätigen damit den Einfluß der LMW-GS auf die Backqualität der bisher nur auf physiologischer Basis nachgewiesen wurde.

Desweiteren wurde eine morphologische Analyse des Merkmals "freidreschend", das für die freidreschende Ährenform des Weizens *T. monococcum* var. *sinskajae* steht, durchgeführt. Das Merkmal konnte auf Chromosom 2 kartiert werden.

## 6. Literaturverzeichnis

Abdel-Aal E-S.M., P. Hucl, F.W. Sosulski, P.R. Bhirud (1997) Kernel, milling and baking properties of spring-type spelt and einkorn wheats. *J. Cer. Sci.* 26: 363-370

American Association of Cereal Chemists (1995) Approved Methods of the AACC. The Association: St. Paul MN

Anderson J.A., Y. Ogihara, M.E. Sorrells, S.D. Tanksley (1992) Development of a chromosomal arm map for wheat based on RFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* 83: 1035-1043

Auricchio S., G. De Ritis, M. De Vincenzi, P. Occorsio, V. Silano (1982) Effects of gliadin-derived peptides from *Bread* and *Durum* wheats on small intestine cultures from rat fetus and coeliac children. *Pediatr. Res.* 16: 1004-1010

Bai D., D.R. Knott, J.M. Zale (1998) The inheritance of leaf and stem rust resistance in *Triticum monococcum* L. *Can. J. Plant Sci.* 78: 223-226

Bartels D., I. Altosaar, N.P. Harberd, R.F. Baker, R.D. Thompson (1986) Molecular analysis of  $\gamma$ -gliadin families at the complex Gli-1 locus of bread wheat (*T. aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 72: 845-853

Becker J., P. Vos, M. Kniper, F. Salamini, M. Heun (1995) Combined mapping of RFLP and AFLP markers in barley. *Mol. Gen. Genet.* 249: 65-73

Borghini B., R. Castagna, M. Corbellini, M. Heun, F. Salamini (1996) Breadmaking quality of Einkorn wheat (*Triticum monococcum* ssp. *monococcum*). *Cereal Chem.* 73(2): 208-214

Botstein D., R.L. White, M. Skolnick, R.W. Davis (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32: 314-331

Breese E.L., Mather K. (1957) The organization of polygenic activity within a chromosome in *Drosophila*. I Hair characters. *Heredity* 11: 373-395

Breiman A., D. Graur (1995) Wheat evolution. *Isr. J. Plant Sci.* 43: 85-98

- Cao W., G. Scoles, P. Hucl, R.N. Chibbar (1999) The use of RAPD analysis to classify *Triticum* accessions. *Theor. Appl. Genet.* 98: 602-607
- Castagna R. (1992) Induced chlorophyll mutations in *Triticum monococcum* L. *J. Genet. and Breed.* 45: 373-376
- Castagna R., B. Borghi, G. Bossinger, F. Salamini (1993) Induction and characterization of *T. monococcum* mutants affecting plant and ear morphology. *J. Genet. Breed.* 47: 127-138
- Castagna R., G. Maga, M. Perenzin, M. Heun, F. Salamini (1994) RFLP-based genetic relationships of Einkorn wheats. *Theor. Appl. Genet.* 88: 818-823
- Castagna R., B. Borghi, N. Di Fonzo, M. Heun, F. Salamini (1995a) Yield and related traits of einkorn (*T. monococcum* ssp. *monococcum*) in different environments. *Eur. J. Agron.* 4: 371-378
- Castagna R., B. Borghi, M. Heun, F. Salamini (1995b) Integrated approach to einkorn wheat breeding. *Proc. 1<sup>st</sup> Int. Workshop on Hulled Wheats*. Padulosi S., K. Hammer, J. Heller (eds)
- Castiglioni P., C. Pozzi, M. Heun, V. Terzi, K.J. Müller, W. Rohde, F. Salamini (1998) An AFLP-based procedure for the efficient mapping of mutations and DNA probes in barley. *Genetics* 149: 2039-2056
- Chao S., P. J. Sharp, A. J. Worland, E. J. Warham, R. M. D. Koebner, M. D. Gale (1989) RFLP-based genetic maps of wheat homoeologous group 7 chromosomes. *Theor. Appl. Genet.* 78: 495-504
- Ciaffi M., L. Dominici, D. Lafiandra (1997) Gliadin polymorphism in wild and cultivated einkorn wheats. *Theor. Appl. Genet.* 94: 68-74
- Conforti F.D., J.M. Johnson, M. Alley (1993) The effects of nitrogen fertilization and chlorination on the protein and fatty acid contents of soft red winter wheat flour, and their influence on the baking quality for angel food cake. *J. Cer. Sci.* 18: 187-195
- Corbellini M., S. Empilli, P. Vaccino, A. Brandolini, B. Borghi, M. Heun, F. Salamini (1999) Einkorn characterization for bread and cookie production in relation to protein subunit composition. *Cereal Chem.* 76: 727-733

- Correns C. (1905) Gregor Mendels Briefe an Carl Nägeli. 1866-1874. Abhandlungen der Mathematisch-Physikalischen Klasse der königlich Sächsischen Gesellschaft der Wissenschaften, Leipzig, 29: 189-265
- Devos K.M., M.D. Atkinson, C.N. Chinoy, C.J. Liu, M.D. Gale (1992) RFLP-based genetic map of the homoeologous group 3 chromosomes of wheat and rye. *Theor. Appl. Genet.* 83: 931-939
- Devos K.M., T. Millan, M.D. Gale (1993) Comparativ RFLP-maps of the homoeologous group 2 chromosomes of wheat, rye and barley. *Theor. Appl. Genet.* 85: 784-792
- Devos K.M., J. Dubcovsky, J. Dvořák, C.N. Chinoy, M.D. Gale (1995) Structural evolution of wheat chromosomes 4A, 5A and 7B and its impact on recombination. *Theor. Appl. Genet.* 91: 282-288
- D'Egidio M.G., S. Nardi, V. Vallega (1993) Grain, flour and dough characteristics of selected strains of diploid wheat, *Triticum monococcum* L. *Cereal Chem.* 70: 298-303
- Dubcovsky J., M.C. Luo, G.Y. Zhong, R. Bransteitter, A. Desai, A. Kilian, A. Kleinhofs, J. Dvořák (1996) Genetic map of diploid wheat, *T. monococcum* L., and its comparison with maps of *Hordeum vulgare* L. chromosomes. *Can. J. Genet. Cytol.* 22: 237-259
- El Attari H., A. Rebai, P.M. Hayes, G. Barrault, G. Dechamp-Guillaume, A. Sarrafi (1998) Potential double-haploid lines and location of quantitative trait loci (QTL) for partial resistance to bacterial leaf streak (*Xanthomonas campestris* pv. *hordei*) in barley. *Theor. Appl. Genet.* 96: 95-100
- Empilli S., L. Rossetti, R. Castagna (1995) Valutazione della variabilità genetica presente in una collezione di germoplasma di frumenti diploidi mediante marcatori morfofisiologici. *Sementi Elette* 5: 21-25
- Every D., M. Gilpin, N.G. Larsen (1996) Ascorbate oxidase levels in wheat and their relationship to baking quality. *J. Cer. Sci.* 23: 145-151
- Feinberg A.P., B. Vogelstein (1983) Technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132: 6-13

- Feldman M., E.R. Sears (1981) Gen reserves in wild forms of wheat. *Spektrum der Wissenschaft* März 1981: 95-105
- Filatenko A.A. und U.K. Kurkiev (1975) A new species: *T. sinskajae* A. *Genetike i Seleksii* 54: 239-241
- Gibson (1984) Studies on the Epstein-Barr virus genome. Ph.D. thesis, Cambridge University, England
- Gill K.S., B.S. Gill, T.R. Endo, T. Taylor (1996) Identification and high density mapping in gene-rich regions in chromosome group 1 of wheat. *Genetics* 144: 1883-1891
- Gimelfarb A., R. Lande (1995) Marker-assisted selection and marker-QTL associations in hybrid populations. *Theor. Appl. Genet.* 91: 522-528
- Gorham J., A. Bristol, E.M. Young, R.G. Wyn Jones (1991) The presence of the enhanced K/Na discrimination trait in diploid *Triticum* species. *Theor. Appl. Genet.* 82: 729-736
- Gupta R.B., J.G. Paul, G.B. Cornish, G.A. Palmer, F. Bekes, A.J. Rathjen (1994) Allelic variation at glutenin subunit and gliadin loci, *Glu-1*, *Glu-3* and *Gli-1*, of common wheats. I. Its additive and interaction effects on dough properties. *J. Cer. Sci.* 19: 9-17
- Gupta R.B., N.K. Singh, K.W. Shepherd (1989) The cumulative effect of allelic variation in LMW and HMW glutenin subunits on dough properties in the progeny of two bread wheats. *Theor. Appl. Genet.* 77: 57-64
- Haley C.S., S.A. Knott (1992) A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. *Heredity* 69: 315-324
- Hammer K. und P. Perrino (1984) Further information on farro (*Triticum monococcum* L. and *T. dicoccon* Schrank.) in south Italy. *Kulturpflanze* 32: 143-151
- Hammer K., W. Hondelmann, W. Plarre (1997) Von der Wild- (Nutzpflanze) zur Kulturpflanze. In: *Biologische Grundlagen der Pflanzenzüchtung*. Odenbach W. (Hrsg), Parey Buchverlag, Berlin, pp 3-7

- Hanahan D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166: 557-580
- Harlan J.R. und D. Zohary (1966) Distribution of wild wheats and barley. Science 153: 1074-1080
- Harlan J.R. (1981) The early history of wheat: Earliest traces to the sack of Rome. In: Wheat Science Today and Tomorrow. Evans L.T. und Peacock W.J. (eds), Cambridge University Press, Cambridge, pp 1-19
- Hauge B.M., S.M. Hanley, S. Cartinhour, J.M. Cherry, H.M. Goodman, M. Koornheef, P. Stam, C. Chang, S. Kempin, L. Medrano, E.M. Meyerowitz (1993) An integrated genetic/ RFLP map of the *Arabidopsis thaliana* genome. Plant J. 3: 745-754
- Heun M., A.E. Kennedy, J.A. Anderson, N.L.V. Lapitan, M.E. Sorrels, S.D. Tanksley (1991) Construction of a restriction fragment length polymorphism map of barley (*Hordeum vulgare*). Genome 34: 437-447
- Heun M., R. Schäfer-Pregl, D. Klawan, R. Castagna, M. Accerbi, B. Borghi, F. Salamini (1997) Site of Einkorn wheat domestication identified by DNA fingerprinting. Science 278: 1312-1314
- Huebner F.R., T.C. Nelsen, O.K. Chung, J.A. Bietz (1997) Protein distributions among hard red winter wheat varieties as related to environment and baking quality. Cereal Chem. 74: 123-128
- Hunter R.L., C.L. Markert (1957) Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. Science 125: 1294-1295
- Hussain A., O.M. Lukov (1997) Influence of gliadin-rich subfractions of Glenlea Wheat on the mixing characteristics of wheat flour. Cereal Chem. 74: 791-799
- Hussien T., R.L. Bowden, B.S. Gill, T.S. Cox (1998) Chromosomal locations in common wheat of three new leaf rust resistance genes from *Triticum monococcum*. Euphytica 101: 127-131
- Hyne V., M.J. Kearsey, D.J. Pike, J.W. Snape (1995) QTL analysis: unreliability and bias in estimation procedures. Mol. Breed. 1: 273-282

- Iyamabo O.E., P.M. Hayes (1995) Effects of plot type on detection of quantitative trait locus effects in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Breed.* 114: 55-60
- Jansen R.C. (1992) A general mixture model for mapping quantitative trait loci by using molecular markers. *Theor. Appl. Genet.* 85: 252-260
- Jansen R.C. (1993) Interval mapping of multiple quantitative trait loci. *Genetics* 135: 205-211
- Jansen R.C. (1996) Complex plant traits: time for polygenic analysis. *Trends in plant science* 1 (3): 89-94
- Jansen R.C., Stam P. (1994) High resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping. *Genetics* 136: 1447-1455
- Kerby K., J. Kuspira (1987) The phylogeny of the polyploid wheats *Triticum aestivum* (bread wheat) and *Triticum turgidum* (macaroni wheat). *Genome* 29: 722-737
- Kerby K., J. Kuspira, B.L. Jones, G.L. Lookhart (1990) Biochemical data bearing on the origin of the B genome in the polyploid wheats. *Genome* 33: 360-368
- Knott S.A., C.S. Haley (1992) Aspects of maximum likelihood methods for the mapping of quantitative trait loci in line crosses. *Genet. Res.* 60: 139-151
- Kochert G. (1994) RFLP technology. In: Phillips and Vasil, 8-38
- Kojima T., T. Nagaoka, K. Noda, Y. Ogihara (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
- Kotani H., T. Hosouchi, H. Tsuruoka (1999) Structural analysis and complete physical map of *Arabidopsis thaliana* chromosome 5 including centromeric and telomeric regions. *DNA Research* 6: 381-386
- Kuspira J., J. MacLagan, R.N. Bhambhani, R.S. Sadasivaiah, N-S. Kim (1989) Genetic and cytogenetic analysis of the A genome of *Triticum monococcum* L. V. Inheritance and linkage relationship of genes determining the expression of 12 qualitative characters. *Genome* 32: 869-881

Lander E.S., D. Botstein (1989) Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121: 185-199

Lander E.S., P. Green, J. Abrahamson, A. Barlow, M. Daly, S.E. Lincoln, L. Newburg (1987) MAPMAKER: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1: 174-181

Lawrence J.M., K.M. Day, E. Huey, B. Lee (1958) Lysine content of wheat varieties, species, and related genera. *Cereal Chem.* 35: 169-178

Lebreton C.M., P.M. Visscher, C.S. Haley, A. Semikhodskii, S.A. Quarrie (1998) A nonparametric bootstrap method for testing close linkage vs. pleiotropy of coincident quantitative trait loci. *Genetics* 150: 931-943

Leonards-Schippers C., W. Gieffers, R. Schäfer-Pregl, E. Ritter, S.J. Knapp, F. Salamini, C. Gebhardt (1994) Quantitative resistance to *Phytophthora infestans* in potato: a case study for QTL mapping in an allogamous plant species. *Genetics* 137: 67-77

Liu C.J., M.D. Atkinson, C.N. Chinoy, K.M. Devos, M.D. Gale (1992) Nonhomoeologous translocations between group 4, 5 and 7 chromosomes within wheat and rye. *Theor. Appl. Genet.* 83: 305-312

Ma H., R.P. Singh, A. Mujeeb-Kazi (1997) Resistance to stripe rust in durum wheats, A-genome diploids, and their amphidiploids. *Euphytica* 94: 279-286

MacRitchie F. (1981) Flour lipids: theoretical aspects and functional properties. *Cereal Chem.* 58: 156-158

Mangin B., B. Goffinet, A. Rebai (1994) Constructing confidence Intervals for QTL location. *Genetics* 138: 1301-1308

Mangin B., P. Thoquet, J. Olivier, N.H. Grimsley (1999) Temporal and multiple quantitative trait loci analysis of resistance to bacterial wilt in tomato permit the resolution of linked loci. *Genetics* 151: 1165-1172

- Marino C.L., J.C. Nelson, Y.H. Lu, M.E. Sorrells, P. Leroy, N.A. Tuleen, C.R. Lopes, G.E. Hart (1996) Molecular genetic maps of the group 6 chromosomes of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L. em. Thell.). *Genome* 39: 359-366
- Martinez O., R.N. Curnow (1992) Estimation the locations and the sizes of the effects of quantitative trait loci using flanking markers. *Theor. Appl. Genet.* 85: 480-488
- McIntosh R.A., G.E. Hart, M.D. Gale (1995) Catalogue of gene symbols of wheat. In: Proceedings of the 8<sup>th</sup> International Wheat Genetic Symposium. Li Z.S., Xin Z.Y. (eds) China Agricultural Sciencetech Press, Beijing, China, pp. 1333-1500
- Meksem K., D. Leister, J. Peleman, M. Zabeau, F. Salamini, C. Gebhardt (1995) A high resolution map of the vicinity of the R1 locus on chromosome V of potato based on RFLP and AFLP markers. *Mol Gen Genet* 249: 74-81
- Metakovsky E.V., G. Branlard, V.M. Chernakov, V.P. Upelniak, R. Redaelli, N.E. Pogna (1997) Recombination mapping of some chromosome 1A-, 1B-, 1D- and 6B-controlled gliadins and low-molecular-weight glutenin subunits in common wheat. *Theor. Appl. Genet.* 94: 788-795
- Mohammadkhani A., F.L. Stoddard, D.R. Marshall (1998) Survey of amlose content in *Secale cereale*, *Triticum monococcum*, *T. turgidum* and *T. tauschii*. *J. Cer. Sci.* 28: 273-280
- Multani D.S., H.S. Dhaliwal, S.K. Sharma, K.S. Gill (1989) Inheritance of Isoproturon tolerance in *Durum* wheat transferred from *Triticum monococcum*. *Plant Breeding* 102: 166-168
- Nagaoka T., Y. Ogihara (1997) Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 94: 597-602
- Naranjo T. (1990) Chromosome structure of durum wheat. *Theor. Appl. Genet.* 79: 397-400
- Naranjo T., A. Roca, P.G. Giocoechea, R. Giraldez (1987) Arm homoeology of wheat and rye chromosomes. *Genome* 29: 873-882
- Nelson J.C., A.E Van Deynze, E. Autrique, M.E. Sorrells, Y.H. Lu, S. Negre, M. Bernard, P. Leroy (1995a) Molecular mapping of wheat. Homoeologous group 3. *Genome* 38: 525-533

Nelson J.C., A.E. Van Deynze, E. Autrique, M.E. Sorrells, Y.H. Lu, M. Merlino, M. Atkinson, P. Leroy (1995b) Molecular mapping of wheat. Homoeologous group 2. *Genome* 38: 516-524

Nelson C.N., M.E. Sorrells, A.E. Van Deynze, Y.H. Lu, M. Atkinson, M. Bernard, P. Leroy, J.D. Faris, J.A. Anderson (1995c) Molecular mapping of wheat: Major genes and rearrangements in homoeologous groups 4, 5 and 7. *Genetics* 141: 721-731

Nicolas Y., J.P. Martinant, S. Denery-Papini, Y. Popineau (1998) Analysis of wheat storage proteins by exhaustive sequential extraction followed by RP-HPLC and nitrogen determination. *J. Sci. Food Agric.* 77: 96-102

Orel V. (1996) *Gregor Mendel: the first geneticist*. Oxford Univ. Press.

Paterson A.H. (ed) (1998) Molecular tools for the study of quantitative traits. In: *Molecular dissection of complex traits*, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 13-29

Payne P.I., J.A. Seekings, A.J. Worland, M.G. Jarvis, L.M. Holt (1987) Allelic variation of glutenin subunits and gliadins and its effect on breadmaking quality in wheat: analysis of F5 progeny from Chinese Spring x Chinese Spring (Hope 1A). *J. Cer. Sci.* 6: 103-118

Phillips R.L., I.K. Vasil (1996) DNA-based marker plants. In: *Genome mapping in plants*. Paterson A.H. (ed), Academic Press, Austin, TX.

Preston K.R., P.R. March, K.H. Tipples (1982) An assessment of the SDS-sedimentation test for the prediction of canadian bread wheat quality. *Can. J. Plant Sci.* 62: 545-553

Qi X., P. Stam, P. Lindhout (1996) Comparison and intergration of four barley genetic maps. *Genome* 39: 379-394

QIAGEN (1996) *Handbücher für QIAex, QIAquick, Plasmid Midi Kit, Protokoll-Vorschlag für genomische DNA-Isolation aus Pflanzenmaterial*, Firmen-Publikation

Sallares R, T.A. Brown (1999) PCR-based analysis of the intergenic spacers of the *Nor* loci on the A genomes of *Triticum* diploids and polyploids. *Genome* 42: 116-128

- Sambrook J., E.F. Fritsch, T. Maniatis (1989) Molecular cloning, Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, NY
- Sánchez-Monge R., G. García-Casado, J.M. Malpica, G. Salcedo (1996) Inhibitory activities against heterologous  $\alpha$ -amylases and in vitro allergenic reactivity of Einkorn wheats. *Theor. Appl. Genet.* 93: 745-750
- Sapirstein H.D., B.X. Fu (1998) Intercultivar variation in the quantity of monomeric proteins, soluble and insoluble glutenin, and residue protein in wheat flour and relationships to breadmaking quality. *Cereal Chem.* 75: 500-507
- Saponaro C., N.E. Pogna, R. Castagna, M. Pasquini, P. Cacciatori, R. Redaelli (1995) Allelic variation at the *Gli-A1<sup>m</sup>*, *Gli-A2<sup>m</sup>* and *Glu-A1<sup>m</sup>* loci and breadmaking quality in diploid wheat *Triticum monococcum*. *Genet. Res.* 66: 127-137
- Sax K. (1923) The association of size differences with seed-coat pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. *Genetics* 8: 552-560
- Schäfer-Pregl R., E. Ritter, L. Concilio, J. Hesselbach, L. Lovatti, B. Walkemeier, H. Thelen, F. Salamini, C. Gebhardt (1998) Analysis of quantitative trait loci (QTLs) and quantitative trait alleles (QTAs) for potato tuber yield and starch content. *Theor. Appl. Genet.* 97: 834-846
- Schiemann E. (1948) Wheat, rye, barley: systematics, history and utilization. Fischer-Verlag, Jena
- Sharma H.C., J.G. Waines (1981) The relationship between male and female fertility and among taxa in diploid wheats. *Amer. J. Bot.* 68(3): 449-451
- Sharma H.C., J.G. Waines, K.W. Foster (1981) Variability in primitive and wild wheats for useful genetic characters. *Crop Science* 21: 555-559
- Singh N.K., K.W. Shepherd (1988a) Linkage mapping of genes controlling endosperm storage proteins in wheat. 1. Genes on the short arm of group 1 chromosomes. *Theor. Appl. Genet.* 75: 628-641

Singh N.K., K.W. Shepherd (1988b) Linkage mapping of genes controlling endosperm storage proteins in wheat. 2. Genes on the long arm of group 1 chromosomes. *Theor. Appl. Genet.* 75: 642-650

Singh N.K., K.W. Shepherd, G.B. Cornish (1991) A simplified SDS-PAGE procedure for separating LMW subunits of glutenins. *J. Cer. Sci.* 14: 203-208

Smith H.H. (1937) The relation between genes affecting size and color in certain species of *Nicotiana*. *Genetics* 22: 361

Smithies O. (1955) Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal human adults. *Bioch.* 61: 629-641

Soller M., T. Brody (1976) On the power of experimental designs for the detection of linkage between marker loci and quantitative loci in crosses between inbred lines. *Theor. Appl. Genet.* 47: 35-39

Sontag-Strohm T., P.I. Payne, H. Salovaara (1996) Effect of allelic variation of glutenin subunits and gliadins on baking quality in the progeny of two biotypes of bread wheat cv. Ulla. *J. Cer. Sci.* 24: 115-124

Soulaka A.B., W.R. Morrison (1985) The bread baking quality of six wheat starches differing in composition and physical properties. *J. Sci. Food Agric.* 36: 719-727

Southern E. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517

Spaner D., B.G. Rosnagel, W.G. Legge, G.J. Scoles, P.E. Eckstein, G.A. Penner, N.A. Tinker, K.G. Briggs, D.E. Falk, J.C. Afele, P.M. Hayes, D.E. Mather (1999) Verification of a quantitative trait locus affecting agronomic traits in two-row barley. *Crop Sci.* 39: 248-252

Stam P. (1993) Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: JOINMAP. *Plant Journal* 3 (5): 739-744

Stam P., J.W. Van Ooijen (1995) JoinMap (tm) version 2.0: Software for the calculation of genetic linkage maps. CPRO-DLO, Wageningen

Stoddart K.L., C. Jermak, R. Nagaraja, D. Schlessinger, N.T. Bech-Hansen (1999) Physical map covering a 2 Mb region in human Xp11.3 distal to DX6849. *Gene* 227: 111-116

Tanksley S.D., M.W. Ganal, J.P. Prince, M.C. de Vincente, M.W. Bomerbale, P. Broun, T.M. Fulton, J.J. Giovannoni, S. Grandillo, G.B. Martin, R. Messegnier, J.C. Miller, A.H. Paterson, O. Pineda, M.S. Roder, R.A. Wing, W. Wu, N.D. Young (1992) High density molecular linkage maps of the tomato and the potato genomes. *Genetics* 132: 1141-1160

Tanksley S.D., M.W. Ganal, G.B. Martin (1995) Chromosome landing: a paradigm for map-based gene cloning in plants with large genomes. *Trends Genet.* 11: 63-68

Tanksley S.D., S.R. McCouch (1997) Seed banks and molecular maps: unlocking genetic potential from the wild. *Science* 277: 1063-1066

Thompson R.D., D. Bartels, N.P. Harberd, R.B. Flavell (1983) Characterization of the multigene family coding for HMW glutenin subunits in wheat using cDNA clones. *Theor. Appl. Genet.* 67: 87-96

Toojinda T., E. Baird, A. Booth, L. Broers, P. Hayes, W. Powell, W. Thomas, H. Vivar, G. Young (1998) Introgression of quantitative trait loci (QTLs) determining stripe rust resistance in barley: an example of marker-assisted line development. *Theor. Appl. Genet.* 96: 123-131

Udall J.A., E. Souza, J. Anderson, M.E. Sorrells, R.S. Zemetra (1999) Quantitative trait loci for flour viscosity in winter wheat. *Crop Sci.* 39: 238-242

Vallega V. (1992) Agronomical performance and breeding value of selected strains of diploid wheat, *Triticum monococcum*. *Euphytica* 61: 13-23

Van Ooijen J.W., C. Maliepaard (1996) MapQTL (tm) version 3.0: software for the calculation of QTL positions on genetic maps. DLO-Centre for Plant Breeding and Reproduction Research. wageningen, The Netherlands

Vos P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. peleman, M. Kuiper, M. Zabeau (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23 (21): 4407-4414

Waugh R., N. Bonar, E. Baird, P. Hayes, A. Graner, W.T.B. Thomas, W. Powell (1997) Homology of AFLP products in three mapping populations of barley. *Mol. Gen. Genet.* 255: 311-321

Weber J.L., P.E. May (1989) Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the PCR. *Am. J. Hum. Genet.* 44: 388-396

Williams J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski, S.V. Tingey (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18 (22): 6531-6535

Zeng B.Z. (1993) Theoretical basis for separation of multiple linked gene effects in mapping quantitative trait loci. *Procl. Natl. Acad. Sci.* 90: 10972-10976

Zeng B.Z. (1994) Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics* 136: 1457-1468

Zohary D. und M. Hopf (1993) Domestication of plants in the old world. Oxford, Clarendon press, p.128