

**Aus dem Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung I  
der Justus-Liebig-Universität Giessen  
Lehrstuhl für Pflanzenzüchtung  
Leiter: Prof. Dr. Dr. h.c. Wolfgang Friedt**

**Genetik der Samenfarbe in *Brassica napus*:  
QTL-Kartierung, Kandidatengene und Assoziationen  
mit Qualitätsmerkmalen**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades im Fachbereich  
Agrarwissenschaften, Ökotoxikologie und Umweltmanagement der  
Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von

**Ana Gloria Badani Méndez**

aus Cochabamba-Bolivien

1.	EINLEITUNG .....	1
1.1.	Verwandtschaft, Variabilität und Samenfarbe in Brassica-Arten .....	1
1.2.	Bedeutung der Gelbsamigkeit für die Rapszüchtung .....	4
1.3.	Genetische Kartierung zur Untersuchung wichtiger agronomischer Merkmale in Brassica napus .....	6
1.4.	Arabidopsis thaliana-Mutanten mit gelber Samenschale .....	9
2.	ZIELSETZUNG .....	10
3.	MATERIAL UND METHODEN .....	11
3.1.	Pflanzenmaterial .....	11
3.2.	Phänotypisierung - Erfassung des Merkmals .....	12
3.2.1.	Ermittlung der Samenfarbe .....	12
3.2.2.	Ermittlung der Qualitätsmerkmale .....	12
3.3.	Genetische Kartierung .....	13
3.3.1.	DNA Extraktion .....	13
3.3.2.	Gelbasierte DNA-(Fragment-)Analysen .....	14
3.3.3.	PCR-Analysen .....	16
3.3.3.1	AFLP-Analysen .....	16
3.3.3.2.	SSR-Analysen .....	18
3.3.3.3.	RAPD-Analysen .....	20
3.3.3.4.	SCAR-Analysen .....	20
3.3.4.	Erstellung der genetischen Kopplungskarte .....	21
3.3.4.1.	Auswertung der PCR-Amplifikationsprodukte .....	21
3.3.4.2.	Genetische Kopplungsanalyse .....	24
3.3.5.	Kartenabgleich und erstellung einer Konsensuskarte .....	25
3.3.6.	QTL-Analysen .....	26
4.	ERGEBNISSE .....	28
4.1.	Phänotypisierung .....	28
4.1.1.	Samenfarbe, ADF-Gehalt und assoziierte Qualitätsmerkmale .....	28
4.1.2.	Korrelationen zwischen Umwelten und Merkmalen in den Populationen YE1 und YE2 .....	29
4.1.3.	Häufigkeitsverteilungen der Merkmale .....	35
4.2.	Genetische Kartierung von YE1 bzw. YE2 .....	40
4.2.1.	Genetische Karte von YE1 .....	41
4.2.2.	Genetische YE2-Karte .....	43
4.2.3.	Kartenabgleich: Konsensuskarte YE1 und YE2 .....	45

4.3.	QTL-Kartierung .....	50
4.3.1.	QTL für Samenfarbe in den Kreuzungen YE1 und YE2 .....	50
4.3.2.	QTL für ADF-Gehalt in den Populationen YE1 und YE2 .....	51
4.3.3.	QTL für Öl- und Proteingehalt in den Populationen YE1 und YE2 .....	54
5.	DISKUSSION .....	55
6.	ZUSAMMENFASSUNG .....	61
7.	SUMMARY .....	63
8.	LITERATURVERZEICHNIS .....	65
9.	ANHANG .....	75
10.	DANKSAGUNG .....	82
	Eidesstattliche Erklärung .....	83

## 1. EINLEITUNG

### 1.1. Verwandtschaft, Variabilität und Samenfarbe in *Brassica*-Arten

Das so genannte 'U'sche Dreieck' (Abb. 1), welches von dem Japaner Morinaga (1934) und dem Koreaner U (1935) zum ersten mal publiziert wurde, zeigt die Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den drei *Brassica*-Grundgenomen: das A-Genom von Rübsen (*B. rapa*), das B-Genom des Schwarzen Senfes (*B. nigra*) und das C-Genom des Kohls (*B. oleracea*). Durch interspezifische Kreuzungen konnten Morinaga und U die drei amphidiploiden Arten Raps (*B. napus*), Brauner oder Indischer Senf (*B. juncea*) und Abyssinischer Senf (*B. carinata*) wiederherstellen. Durch diese so genannten 'Resynthesen' wurde die Herkunft der amphidiploiden *Brassica*-Arten zunächst morphologisch sowie später cytologisch und biochemisch-molekular geklärt. Beim Raps geht man davon aus, dass dieser erst vor ca. 500 Jahren im Mittelmeerraum aus spontanen Kreuzungen der diploiden Arten *B. oleracea* und *B. rapa* entstanden ist; Raps-Wildformen sind nicht bekannt.

Von *B. oleracea* sind ca. 8.935 Akzessionen aus *ex situ*-Genbanken in der europäischen *Brassica*-Datenbank aufgeführt (ECP/GR Bras-EDB; Boukema und van Hintum; <http://www.cgn.wageningen-ur.nl/pgr/collections/brasedb/default.htm>), von *B. rapa* sind es ca. 3.022 Akzessionen. Im Vergleich dazu besitzt *B. napus* - trotz 3.787 vertretenen Akzessionen - eine relativ geringe genetische Variabilität, wie beispielsweise aus der geringen morphologischen bzw. taxonomischen Diversität der Rapse in der Bras-EDB hervorgeht. Resynthesen zwischen den verschiedenen Unterarten und Formen von Kohl und Rübsen stellen eine potenziell sehr nützliche Quelle dar, um neue genetische Diversität für die Rapszüchtung zu generieren. Dies trifft insbesondere für Krankheitsresistenzen zu. Hier wurden in letzter Zeit verschiedene Resistenzgene aus *B. rapa* und *B. oleracea* durch Resynthese in Rapszuchtmaterial übertragen. Auf diese Weise ist aber ebenso ein Transfer von Genen für weitere erwünschte Eigenschaften aus unterschiedlichen *Brassica*-Arten nach *B. napus* möglich, z.B. von solchen für gelbe bzw. helle Samenfarbe.

Bezüglich des Merkmals Samenfarbe bedingt die Kombination von genetischen und Umweltfaktoren in den sechs U'schen *Brassica*-Arten (Abb. 1) ein kontinuierliches Samen-Farbspektrum, welches von schwarz bei *B. oleracea*, *B. nigra* und *B. napus* über braun bis gelb bei *B. rapa*, *B. juncea* und *B. carinata* variiert. Gleichzeitig wurde

beobachtet, dass die gelb-braunen Samen in *B. rapa* (Stringam *et al.* 1974), *B. juncea* (Woods 1980) und *B. carinata* (Getinet *et al.* 1996) aufgrund eines deutlich höheren Ölgehaltes qualitativ hochwertiger sind. Auch das Futtermehl als Pressrückstand besitzt bei gelben Samen im Vergleich zu dunklen Samen einen gesteigerten Proteinanteil bei verringertem Rohfaser-Gehalt. Jedoch gibt es im Sortenspektrum von Winterraps, der dominierenden Rapsform in Europa, bisher keine gelbsamigen Sorten. Bei Sommerraps sind seit einigen Jahren in Kanada gelbsamige Sorten zugelassen.

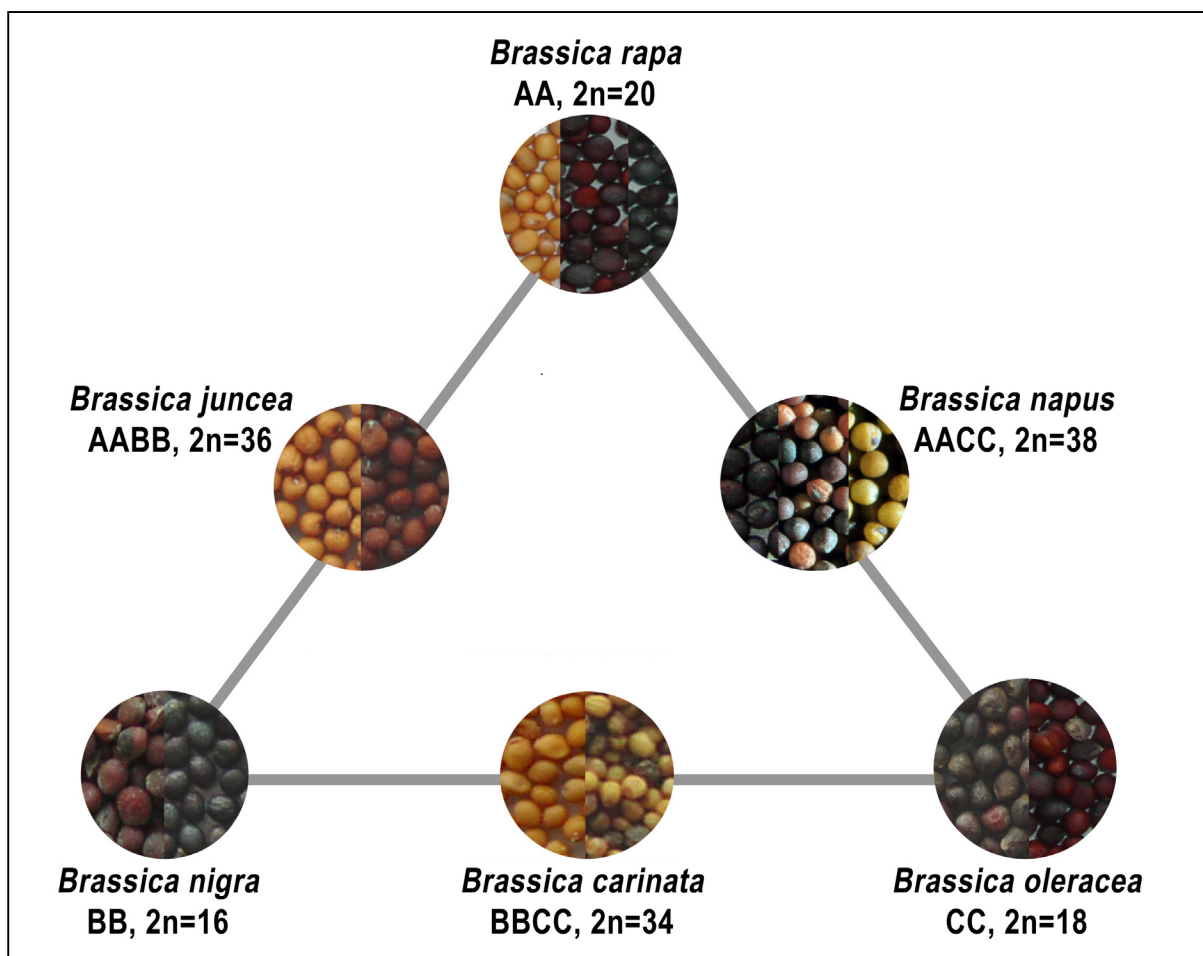


Abb. 1. Das *Brassica*-Dreieck (nach U, 1935) zeigt die Beziehungen zwischen den drei diploiden *Brassica*-Arten und den daraus entstandenen amphidiploiden Arten. Raps (*B. napus*) hat normalerweise schwarze oder braune Samen, aber gelbsamige Formen können durch Kreuzungen mit den nah verwandten Arten erzeugt werden.

An der Entwicklung von gelbsamigem *B. napus* wird seit Jahren weltweit geforscht (Tab. 1). Hierbei wurden ganz unterschiedliche Gelbsamigkeitsquellen verwendet, um via interspezifischer Kreuzungen gelbsamige Rapslinien zu erzeugen. Über die Genetik des Merkmals in den verschiedenen Quellen ist allerdings relativ wenig bekannt.

Tab. 1. Quellen für gelbe Samenfarbe in *Brassica napus*.

Quelle / Kreuzung	Art des Materials	Referenzen
<i>B. oleracea</i> (helle Samen) x <i>B. rapa</i> (gelbe Samen)	Resynthese	Schwetka 1981
( <i>B. rapa chinensis</i> (gelbe Samen) x <i>B. napus</i> ) x <i>B. napus</i>	Interspezifische Kreuzung	Liu 1983
<i>B. oleracea alboglabra</i> (helle Samen) x <i>B. rapa</i> (gelbe Samen) x <i>B. napus</i>	Interspezifische Kreuzung	Shirzadegan & Röbbelen 1985
<i>B.rapa</i> (gelbe Samen) x <i>B. oleracea alboglabra</i> (gelb-braune Samen)	Resynthese	Chen <i>et al.</i> 1988
( <i>B. carinata</i> (partial gelbe Samen) x <i>B. rapa</i> ) x <i>B. napus</i> <i>B. napus</i> x <i>B. rapa</i>	Interspezifische Kreuzung	Zaman 1988
( <i>B. napus</i> x <i>B. juncea</i> (gelbe Samen)) x <i>B. napus</i> ( <i>B. napus</i> x <i>B. carinata</i> (gelbe Samen)) x <i>B. napus</i>	Interspezifische Kreuzung	Rashid <i>et al.</i> 1994
<i>B. napus</i> ( helle Samen) x <i>B. carinata</i> (gelbe Samen)	Interspezifische Kreuzung	Qi <i>et al.</i> 1995
( <i>B. rapa</i> x <i>B. oleracea</i> ) x <i>B. napus</i> <i>B. napus</i> x <i>B. juncea</i> <i>B. napus</i> x <i>B. rapa</i>	Interspezifische Kreuzung	Tang <i>et al.</i> 1997
<i>B. rapa</i> (gelbe Samen) x <i>B. carinata</i>	Interspezifische Kreuzung	Meng <i>et al.</i> 1998
( <i>B. oleracea alboglabra</i> (gelbe Samen) x <i>B. carinata</i> ) x <i>B. rapa</i> var. Sarson ( <i>B. oleracea alboglabra</i> (schwarze Samen)) x <i>B.rapa</i> var. Sarson (gelbe Samen) <i>B. carinata</i> (gelbe Samen) x <i>B.rapa</i> var. Sarson (gelbe Samen)	Interspezifische Kreuzung	Rahman 2001, 2003
<i>B. rapa</i> (gelbe Samen) x <i>B. alboglabra</i> (braun-schwarze Samen)	Interspezifische Kreuzung	Heneen & Bismark 2001

Das Auftreten der gelben Samenfarbe beruht auf einer transparenten Samenschale, die den gelben Embryo sichtbar werden lässt. Im Vergleich zu den dunkelsamigen Genotypen werden hier nur wenige der aus hauptsächlich polyphenolischen Tanninen bestehenden Samenschalen-Pigmenten in das Parenchym eingelagert (Leung *et al.* 1979, Hu 1988 bei Rahman *et al.* 2001); diese Flavonoid-Stoffgruppe tritt oft assoziiert mit Färbungen von Pflanzengewebe auf (Nørbæk *et al.* 1999).

## 1.2. Bedeutung der Gelbsamigkeit für die Rapszüchtung

Im Laufe der letzten 30 Jahre hat sich der Raps (engl. *Oilseed Rape* oder *Canola* als Sammelbezeichnung für Ölraps und andere Ölfrucht-Brassicaceae) zu einem wichtigen Agrarprodukt vor allem der gemäßigten Breiten entwickelt. Erst durch eine intensive züchterische Bearbeitung in den 1970er und 80er Jahren und der damit verbundenen Entwicklung von so genannten 00-Sorten (erucasäurefrei, geringer Glucosinolat-Gehalt; Stefansson 1983, Downey und Röbbelen 1989, Downey 1990) wurde Raps zu einem wichtigen Speiseöl-Lieferanten. Raps steht mittlerweile weltweit an dritter Stelle sowohl als Speiseöl- (hinter Soja- und Palmöl) als auch als Ölschrot-Lieferant (hinter Soja und Baumwolle). Im Erntejahr 2003/2004 wurde bei den sieben Hauptölfrüchten mit einer Weltpflanzenöl-Produktion in Höhe von 335 Millionen Tonnen gerechnet, wobei Soja mit 187 Millionen Tonnen klar an erster Stelle liegt, gefolgt von Raps/Canola mit 39 Millionen Tonnen (FAO 2004). In Europa ist der Raps die mit Abstand wichtigste Ölpflanze, wobei der besondere Wert des Rapsöls in seinen vielschichtigen Anwendungsbereichen liegt.

Der Ölgehalt ist ein sehr wichtiges Zuchtziel bei allen Ölpflanzen, beim Raps vor allem wegen seines primären wirtschaftlichen Wertes und seiner relativ hohen Heritabilität (Grami *et al.* 1977). Der bisherige Erfolg der Züchtungsarbeit beruht vor allem auf der einfachen und schnellen Bestimmung des Ölgehaltes durch nicht-destruktive NMR-Techniken (*nuclear magnetic resonance*). Der Ölgehalt zeigt – wie auch andere Sameninhaltsstoffe – bei *Brassica*-Ölfruchtarten eine große Variationsbreite und hängt dabei sowohl von genetischen (z.B. Art, Sorte, Kulturform) als auch von Umwelt-Effekteneinflüssen ab (z.B. Temperatur, Wasser- und Nährstoffversorgung). Er liegt zwischen 36 und 50 Prozent (bezogen auf das Trockengewicht), während die Öl-Pressrückstände einen Proteinanteil von 33 bis 48%

aufweisen (Canvin 1965, Appelqvist und Ohlson 1972, Arnholdt und Schuster 1981, Marquard und Schuster 1981, Salunkhe *et al.* 1992). Obwohl Öl- und Proteingehalt negativ miteinander korreliert sind, kann ein Zuchtfortschritt durch die Selektion auf die Summe beider Samenkomponenten erzielt werden (Grami *et al.* 1977, Arnholdt und Schuster 1981, Stefansson 1983).

Neben dem Proteingehalt ist außerdem der Rohfasergehalt von großer Bedeutung bei der Nutzung der Ölsaaten nicht nur als Öl-Lieferant, sondern auch als wichtige Ressource für die Tierfütterung in Form von Schrot-Rückständen nach der Ölgewinnung. So nehmen die Rapsöl-Pressrückstände in Deutschland nach Sojaprodukten den zweiten Platz in der Rangfolge der Eiweißfuttermittel ein, obwohl der Raps im Gegensatz zur Sojabohne in erster Linie als Öl-Lieferant angebaut wird. Rapsschrot besitzt einen hohen Proteingehalt; der Gehalt an den für die Tierernährung essenziellen Aminosäuren Methionin und Cystein ist sogar höher als im Sojaschrot. Neben den für die Tierernährung positiven Eigenschaften weist das Rapsschrot jedoch auch antinutritive Stoffe auf. Hier sind im besonderen der Rohfaseranteil (ca. 15% des getrockneten Ölpressrückstandes, Shahidi 1990, Thies 1991, Salunkhe *et al.* 1992) und der Tanningehalt von Bedeutung, außerdem Sinapinsäure-Ester (Phytinsäure, Phytate) und Phenolsäuren sowie bei Nicht-00-Material auch Glucosinolate und/oder Erucasäure. Wegen der geringen Samengröße steuert die Samenschale, die etwa 10-20% des Samengewichtes ausmacht, einen Großteil zum Faseranteil im Pressrückstand bei (Appelqvist und Ohlson 1972, Anjou *et al.* 1977).

Aus diesem Grund stellt die Reduzierung des Tannin- und Rohfasergehaltes in Form eines verringerten Schalenanteils zweifellos ein aktuelles Ziel der Qualitätszüchtung hin zu einem gesteigerten Öl- und Proteingehalt dar. Hiermit ist eine - aufgrund deutlich verringerter Dicke - transparente bzw. gelbe (in geringerem Maße auch braune) Samenschale stark korreliert, wie sie bei rein gelbsamigen Sorten in der Sarson-Unterart von *B. rapa* oder in *B. juncea* auftritt. Gelbsamigkeit trägt somit zu einer deutlichen Verbesserung des Futterwertes des Presskuchens nach der Ölextraktion bei (Shirzagedan und Röbbelen 1985, Slominsky *et al.* 1994, 1999). Ein Zusammenhang zwischen heller Samenschalenfarbe und geringem Fasergehalt wird wegen des Vorkommens gemeinsamer Vorstufen in der Lignin- und Pigmentbiosynthese angenommen, z.B. von p-Cumarat (Theander *et al.* 1977, Whetten *et al.* 1998). Daneben wurde beschrieben, dass eine dünnere Samenschale bei gelbsamigem Ölrap



mit einem erhöhten Samenölgehalt und/oder Proteingehalt korreliert ist (Xiao und Liu 1982, Piotrowska *et al.* 2003). Noch etwas detaillierter als durch die Rohfaser allein wird der Bereich der Zellwandbestandteile durch den ADF- (*acid detergent fibre*) bzw. NDF-Gehalt (*neutral detergent fibre*) beschrieben. ADF umfasst Lignin und Cellulose, während NDF neben ADF noch Hemicellulose beinhaltet. Diese beiden Komponenten setzen den Futtermittelwert herab und zählen daher zu den wesentlichen Faktoren, die die Gesamtqualität des Raps-Presskuchens nach der Ölextraktion mit bestimmen.

Interspezifische Kreuzungen in Form von Raps-Resynthesen stellen hier eine wichtige Quelle von Rohfaseranteil- bzw. Samenfarben-Variation für die Züchtung von hellsamigen Raps dar. Daneben besitzen sie ein großes Potenzial bei der Erhöhung der genetischen Variation und der Qualitätssteigerung des Ölrapses. So zeigten Nachkommen einer Kreuzung zwischen *B. rapa* ssp. *trilocularis* (Yellow Sarson) und mehreren ausgewählten Blumenkohl-Akzessionen (*B. oleracea* convar. *botrytis* var. *botrytis*) neben Variation im Fettsäuremuster eine hohe genetische Distanz zu den konventionellen Sorten (Seyis *et al.* 2003), was sie zusätzlich zu Kandidaten für die Erhöhung der potentiellen Heterosis macht.

Bezüglich einer Erfassung der verschiedenen Samenmerkmale wurden verschiedene Methoden beschrieben. So verwendeten Baetzel *et al.* (2003, 2004) ein digitales Bildauswertungssystem (MARVIN), um die Samenfarbe an Hand von digital-optischer Messung der Lichtreflexion von Samenproben als reproduzierbaren Messwert zu ermitteln. Die Qualitätsmerkmale Öl- und Proteingehalt sowie Fettsäuremuster sind routinemäßig mit Hilfe der Nah-Infrarot-Spektroskopie (NIRS) zu bestimmen. Font *et al.* (2003, 2005) entwickelten - basierend auf ADF-Messungen in *B. carinata*, *B. juncea* und *B. napus* sowie mit Hilfe eines Meß-Verfahrens von Goering und van Soest (1970) - eine entsprechende NIRS-Kalibrierungstechnik für den ADF-Anteil in *B. napus*-Samen.

### **1.3. Genetische Kartierung zur Untersuchung wichtiger agronomischer Merkmale in *Brassica napus***

Obwohl morphologische Marker in einigen der *Brassica*-Arten für genetische Analysen angewandt wurden (Sampson, 1966), hatten sie wegen ihrer zu geringen Anzahl nur minimalen Nutzen für die Kartierung von Genen.

Die Untersuchungen von Arus und Orton (1983) zur Vererbung und Kopplung von Isoenzym-Loci in *B. oleracea* stellten den ersten Schritt hinsichtlich einer Entwicklung von molekularen Markern und ihrer Anwendung in der Erstellung von Kopplungskarten in *Brassica* dar.

Anfang der 80er Jahre wurde vorgeschlagen, dass eine große Anzahl von genetischen Markern durch die Analyse von Unterschieden in den Molekülen der DNA-Erbsubstanz selbst entdeckt und genutzt werden könnte. Dies geschah zunächst in Form von *restriction fragment length polymorphisms* (RFLP; Botstein *et al.* 1980), später mit *random amplified polymorphic DNAs* (RAPD; Williams *et al.* 1990), *simple sequence repeats* (SSR; Herne *et al.* 1992) *sequence-tagged sites* (STS; Fukuoka *et al.* 1994), *inter-simple sequence repeats* (ISSR; Zietkiewicz *et al.* 1994), *amplification fragment length polymorphisms* (AFLP; Vos *et al.* 1995) und anderen DNA-basierten Methoden, die in den letzten Jahren vor allem auf PCR-Basis entwickelt und für die Erstellung genetischer Karten und von Gen-Markern eingesetzt wurden.

In *Brassica* begannen die Kartierungsarbeiten zu Beginn der 1990er Jahre zum einen mit dem Ziel, die Beziehungen zwischen den Genomen der verschiedenen Kulturarten zu verstehen, zum anderen um die erstellten Karten für die angewandte Genetik und Züchtung der verschiedenen *Brassica*-Fruchtarten zu nutzen. So beschränkten sich die Genomkartierungen wegen seiner wirtschaftlichen Bedeutung hauptsächlich auf *B. napus* sowie auf die drei diploiden Kulturarten *B. nigra*, *B. oleracea* und *B. rapa*. Vor kurzem wurde auch bei *B. juncea* mit Kartierungsstudien begonnen (Lakshmi Padmaj *et al.* 2005).

Für den Raps wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen unabhängig mehrere Kopplungskarten publiziert, die erste genetische Karte stammte von Landry *et al.* (1991). Für eine ausführliche Übersicht zur genetischen Kartierung bei *B. napus* vgl. Snowdon und Friedt (2004).

Einige agronomisch oder ökonomisch bedeutende Merkmale von Kulturpflanzen, die für Pflanzenzüchter von Interesse sind, zeigen jedoch keine genetische Spaltung nach dem Modell der Mendel'schen Vererbung. Sie werden polygenisch vererbt und variieren kontinuierlich, während mendelnde Merkmale meist monogenisch vererbt werden und diskontinuierlich variieren. Quantitative Merkmale werden durch eine größere Anzahl mendelnder Faktoren bedingt, sogenannte *Quantitative trait loci* (QTL), die über das gesamte Genom verteilt sind und zum Teil interagieren, wobei der Beitrag eines

einzelnen Locus sehr klein sein kann. Ihre Ausprägung unterliegt zudem nicht-genetischen Effekten, die allgemein als Umwelteinflüsse bezeichnet werden, d.h. die Vererbung quantitativer Merkmale ist durch die Effekte einzelner Gene im Zusammenspiel mit erklärten und nicht erklärten Umwelteffekten bedingt (Falconer 1984). Auch bei der Gelbsamigkeit handelt es sich um ein solches Merkmal.

Die Aufklärung des Vererbungsmechanismus und die Entwicklung von genetischen Markern für solche komplexen und umweltabhängigen Merkmale wie die Samenfarbe ist somit von großem Interesse. Bei kultivierten Brassicas wurden hinsichtlich der Vererbung der gelben Samenfarbe bereits verschiedene Mechanismen vorgeschlagen. Nach Shirzadegan (1986), Henderson und Pauls (1992) sowie Van Deynze *et al.* (1995) sind in *B. napus* drei Gene an der genetischen Kontrolle der Samenschalenfarbe beteiligt, und nur Linien, bei denen an allen drei Loci homozygot-rezessive Allele vorliegen, können die gelbe Samenfarbe weiter vererben. Heneen und Brismar (2001) hingegen schlugen eine Kombination aus maternaler und embryonaler Kontrolle der Samenfarbe in der diploiden Art *B. oleracea alboglabra* mit Loci auf drei verschiedenen C-Genom-Chromosomen vor, während Lionneton *et al.* (2004) zwei mendelnde Merkmalsloci in *B. juncea* als verantwortlich für die Vererbung der Gelbsamigkeit identifizierten. Andererseits lokalisierten Somers *et al.* (2001) in einer DH-Population aus einer F<sub>1</sub> der Raps-Kreuzung 'Apollo' (schwarzsamig) x 'YN90-1016' (gelbsamig) mittels *bulked segregant analysis* (Michelmore *et al.* 1991) ein einzelnes, von acht RAPD-Markern flankiertes Major-Gen, welches 72 % der phänotypischen Variation der Samenfarbe erklärte. Weitere Analysen des gelbsamigen Teils dieser DH-Population deckten zwei weitere, 'Apollo'-Allele bevorzugende Gene auf, die 11 bzw. 8,5 % der Variation in der Samenfarbe bedingen. Die Autoren schlugen vor, dass das Haupt-Gen partiell dominant mit den beiden zusätzlichen epistatischen Loci interagiert. Dieses Ergebnis wurde von Liu *et al.* (2005a) unterstützt, deren Analysen der Spaltungsverhältnisse in Kreuzungen zwischen schwarzsamigem und resynthesiertem, gelbsamigem Raps auf ein partiell dominantes Majorgen für gelbe Samenfarbe hinwiesen, welches epistatische Effekte auf zwei dominante Gene für schwarze Samenfarbe ausübt. Dass allein dieses Majorgen einen Haupteffekt auf Samenfarbe hat, demonstrierten Liu *et al.* (2005b) in Kreuzungen der gleichen gelbsamigen Linie mit anderen schwarzsamigen Eltern. In diesem Fall zeigten die Nachkommen eine Spaltung für Samenfarbe, die mit einem einzigen dominanten Gen für gelbe Samenfarbe erklärt werden konnte. Allerdings sind bisher weder die verantwortlichen Gene noch ihre

vermuteten Effekte bekannt. Genauso wenig ist geklärt, ob bei Ölrap, der aus abweichendem gelbsamigen Material abgeleitet wurde, die gleichen Gen-Loci an der Expression der gelben Samenfarbe beteiligt sind.

#### 1.4. *Arabidopsis thaliana*-Mutanten mit gelber Samenschale

Eine Selektion auf den gelbschaligen Samen-Phänotyp ist wegen starker Umwelteinflüsse, insbesondere der Temperatur, schwierig (Van Deynze *et al.* 1993, Van Deynze & Pauls 1994, Rakow *et al.* 1999), und bisher sind beim Winterrap keine effektiven genetischen Marker vorhanden, die mit den merkmalskontrollierenden Genen gekoppelt wären. Obwohl eine Vielzahl verschiedener *Arabidopsis thaliana*-Mutanten mit einem analogen Phänotyp beschrieben wurden, konnte noch keines der Gene klar identifiziert werden, die für die Expression der gelben Samenschale in *Brassica* verantwortlich sind. Die Gen-Orte, die in der Samenschale von *A. thaliana* die Synthese und/oder Einlagerung von braunen Pigmenten (kondensierte Tannine) beeinflussen, werden in ihrer Gesamtheit als *transparent testa* (*tt*)-Loci bezeichnet, und sie alle stellen interessante Kandidaten-Gene für Untersuchungen des analogen Merkmals in Ölrap dar. Das samen-spezifische Gen *TT1* spielt bei *Arabidopsis* in der Entwicklung des Samen-Endotheliums eine Rolle, in welches die braunen Tannin-Pigmente eingelagert werden (Sagasser *et al.* 2002). Verschiedene andere Loci (*tt3*, *tt4*, *tt5*, *tt6* und *ttG*) spielen bei der Anreicherung von violetten Anthocyanidinen in Blättern und Stängeln eine zentrale Rolle, wobei *ttG* auch an der Trichom- und Wurzelhaarbildung beteiligt ist (Koorneef 1994). Die Biosynthese der Flavonoide wurde von Winkel-Shirley (2001) detailliert beschrieben, und eine Vielzahl von *A. thaliana*-Enzymen der Flavonoid-Biosynthese konnte identifiziert und mit spezifischen *tt*-loci in Zusammenhang gebracht werden, z. B. Chalcon-Synthase (CHS) mit *tt4* (Feinbaum und Ausubel 1988), Chalcon-Isomerase (CHI/CFI) mit *tt5* (Shirley *et al.* 1992), Dihydroflavonol-4-Reduktase (DFR) mit *tt3* (Shirley *et al.* 1992), Flavanon-3-Hydroxylase (F3H) mit *tt6* (Wisman *et al.* 1998) und Flavanon-3'-Hydroxylase (F3'H) mit *tt7* (Schoenbohm *et al.* 2000); vgl. Abb. 17. Obwohl diese *tt*-Gene bei *Arabidopsis* nur single copy-Sequenzen darstellen, konnten mehrfache Kopien ihrer Orthologe in *B. napus* via BAC-Bibliotheken-Screening mit physikalisch funktionellen Markern (innerhalb von 50kb der Gen-Sequenzen gelegen) gefunden werden (Lotz *et al.* 2003).

## 2. ZIELSETZUNG

Das Ziel der vorliegenden Studie war die Aufklärung der genetische Kontrolle der Samenfarbe in verschiedenen Kreuzungen durch die Lokalisierung von quantitativen Merkmalsloci (*Quantitative trait loci*, QTL) für Samenfarbe und assoziierte Merkmale. Zwei Populationen wurden verwendet, die auf zwei Winterölraps-Kreuzungen zwischen jeweils einer unterschiedlichen Gelbsamigkeitsquelle und verschiedenen schwarzsamigen Eltern zurück gingen. Durch Abgleichen der dabei entwickelten Karten mit Hilfe von Referenz-Markern wurden die Positionen der Samenfarben-QTL in beiden Kreuzungen verglichen. Darüber hinaus sollten erste Informationen über die genetischen Zusammenhänge zwischen Samenfarbe und Rohfaser-Gehalt angestrebt werden. Zur Erstellung eines Modells der genetischen Kontrolle der gelben Samenfarbe in *B. napus* wurden die vermuteten Effekte der verantwortlichen Gen-Loci, potenzielle Kandidaten-Gene, Assoziationen mit relevanten Samenqualitätsmerkmalen sowie ihre Bedeutung für die Züchtung von gelbsamigem Raps untersucht.

### 3. MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1. Pflanzenmaterial

Die genetische Lokalisierung von QTL für Gelbsamigkeit wurde anhand zweier Kartierungs-Populationen durchgeführt, die aus verschiedenen Gelbsamigkeitsquellen erstellt wurden (Tab. 2). Der erste gelbsamige Raps stammt aus einer gelbsamigen *Brassica rapa* Linie, die mit *Brassica napus* zweimal rückgekreuzt wurde. Die daraus entstandene gelbsamige Raps-Linie 'T-25629' wurde mit der Erucasäure-haltigen, schwarzsamigen *B. napus* DH-Linie '26-96' gekreuzt und aus dieser Kreuzung die spaltende DH-Population YE1 mit insgesamt 285 DH-Linien entwickelt (Baetzel 2004). Die zweite Gelbsamigkeitsquelle geht auf eine Resyntheseraps-Linie der Universität Göttingen zurück, die Anfang der 80er Jahre von Gland (1982) mit dem Ziel einer Erhöhung des Glucosinolatgehaltes erstellt wurde. Bei einer spontanen Kreuzungsresynthese fand Gland auch zufällig eine gelbsamige Linie. Die hieraus resultierende gelbe Rapslinie '1012-98' wurde mit einer Inzuchtlinie der Hochleistungsrapssorte 'Express' (Express 617) gekreuzt und daraus die F<sub>2</sub>-Population YE2 mit 1394 Individuen erstellt (Baetzel *et al.* 2003). Die Kartierungspopulationen werden im weiteren als YE1 bzw. YE2 bezeichnet.

Tab. 2. Spaltende Populationen aus Kreuzungen zwischen homozygoten Linien zweier verschiedener Gelbsamigkeitsquellen mit zwei unterschiedlichen schwarzsamigen Rapslinien.

Population	Herkunft der Gelbsamigkeit	Mutter-Linie / Sorte	Vater-Linie / Inzuchtlinie	Anzahl Linen bzw. Individuen insgesamt/ untersucht
YE1	Intersp. Kreuzung ( <i>B. rapa</i> x <i>B. napus</i> ) x <i>B. napus</i>	T 25629 Canola-Qualität (E2) <sup>1)</sup>	DH 26-96 (++)-Qualität (E1) <sup>1)</sup>	285 / 105 (DH)
YE2	Resynthese <i>B. oleracea</i> x <i>B. rapa</i>	Express 617 Canola-Qualität (E3) <sup>1)</sup>	1012-98 Canola-Qualität (E4) <sup>1)</sup>	1394 / 179 (F <sub>2</sub> )

1) Kurzbezeichnung der Eltern in weiteren Teilen der Arbeit

### **3.2. Phänotypisierung - Erfassung des Merkmals**

Die DH-Linien der Population YE1 wurden 2001/2002 in zwei verschiedenen Umwelten angebaut, einmal im Gewächshaus (Tag 24°C/Nacht 20°C, 16 Std. Tageslicht) und einmal im Feld (Forschungsstation Rauischholzhausen bei Marburg/Lahn). Das erhaltene Saatgut wurde am Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung I bezüglich des Phänotyps Samenfarbe sowie der Qualitätsmerkmale ADF-Gehalt, Ölgehalt und Proteingehalt untersucht.

Die F<sub>2</sub>-Pflanzen der Population YE2 wurden 1999/2000 an der Versuchstation Einbeck (KWS Saat AG) und an der Versuchstation Thüle (DSV) jeweils im Feld angebaut; auch hier fand die Phänotypisierung und Qualitätsanalyse des F<sub>3</sub>-Saatgutes am Institut in Gießen statt.

#### **3.2.1. Ermittlung der Samenfarbe**

Die Ermittlung der Samenfarbe basiert häufig auf einer visuell geschätzten Bonitur. Um quantitative Daten für die QTL-Analyse zu ermitteln, wurde das digitale Bildauswertungssystem MARVIN (GTA Sensorik, Neubrandenburg) verwendet (Baetzel *et al.* 2004). Hiermit wurde das Samenmaterial (ca. 200 Samen je Probe) fotografiert und quantitative Werte für die Helligkeit des Saatguts festgelegt. Das Ergebnis für die Samenfarbe eines einzelnen Genotyps beruht dabei auf dem Mittelwert aller vom Gerät einzeln gemessenen Samen.

#### **3.2.2. Ermittlung der Qualitätsmerkmale**

Die Qualitätsmerkmale ADF-Gehalt, Öl- und Proteingehalt wurden mittels Nah-Infrarot-Reflexions-Spektroskopie (NIRS) gemessen und in Prozent der Trockenmasse (% TM) angegeben.

Zur Auswertung der Korrelationen und Häufigkeitsverteilung der Qualitätsmerkmale wurde das Programm SPSS für Windows Version 12.0.1 verwendet. Einfache sowie partielle Korrelationen zwischen den verschiedenen Merkmalen wurden berechnet, und die Häufigkeitsverteilungen wurden mit den Angaben Intervall-Zahl = 14, Größe der Intervalle = 0,39 und Startpunkt = 0% erstellt.

### 3.3. Genetische Kartierung

Für die spaltenden Populationen YE1 und YE2 wurde eine genetische Karte mit Hilfe molekularer Marker erstellt. Für alle eingesetzten Marker-Typen (AFLPs, SSRs, RAPDs, SCARs; vgl. 1.3) wurden zunächst die Eltern der jeweiligen Populationen auf Polymorphismen in ihren resultierenden Fragmentmustern untersucht. Mit Primer(paare)n, die eindeutige Polymorphismen zwischen den Eltern generierten, wurden anschließend die YE1-DH-Linien und YE2-F<sub>2</sub>-Individuen der Kartierungs-Populationen analysiert und ihr Marker-Genotyp festgestellt. Auf diese Weise wurden zwei Datensätze erstellt, die als Grundlage für die Berechnung der genetischen Kopplungskarten dienten.

Sämtliche Puffer, die in den nachfolgend beschriebenen molekulargenetischen Analysen verwendet wurden (Volumina und Konzentrationen), sind im Anhang in den Tab. A1 bis A4 aufgeführt.

#### 3.3.1. DNA Extraktion

Zur Gewinnung der DNA wurde die Methode nach Doyle & Doyle (1990) mit leichten Modifikationen angewendet. Gesamtgenomische DNA aus 105 Pflanzen der DH-Population YE1 wurde in Gießen isoliert, DNA-Proben der F<sub>2</sub>-Pflanzen der Population YE2 wurden von den Firmen KWS und DSV zur Verfügung gestellt.

Von jeder zu untersuchenden Raps-Linie wurden 2,5 g gefrorene Blätter unter flüssigem Stickstoff zu Pulver zermahlen. Dieses wurde in 50 ml Polypropylen-Röhrchen (Falcon-Tubes) mit 15 ml des auf 65°C erhitzten Doyle & Doyle-Extraktionspuffers (Anhang, Tab. A1) versetzt. Die Röhrchen wurden 5 min geschwenkt und für 30 min in ein 65°C-Wasserbad gestellt. Danach wurden 15 ml CIA (Chloroform : Isoamylalkohol; 24:1 v/v) auf die Proben gegeben und für 10 min geschwenkt. Die Proben wurden anschließend 10 min bei 2800 U/min und 4°C in einer Kühlzentrifuge (Beckmann GS-6KR) zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde abpipettiert und in ein neues Röhrchen überführt. Zu diesem Überstand wurden 12 ml CIA pipettiert, für 8 min geschwenkt und bei 3000 U/min und 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder abpipettiert und in ein neues Röhrchen gegeben. Zur wässrigen DNA-Lösung wurden 1 ml NaCH<sub>3</sub>COO (3 M, pH 5,5) und 1 ml NH<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>COO (10 M) gegeben und mit 2/3 VT Isopropanol (4°C) aufgefüllt. Dieses Gemisch wurde vorsichtig



geschwenkt, wobei die DNA als fadenförmige, weiße Substanz ausfiel. Die DNA wurde aus der Fällungslösung entfernt und in ein Röhrchen mit ca. 1 ml 70% Ethanol/10 mM  $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$  überführt. Hierin verblieb die DNA für mindestens 10 min. Anschließend wurde sie ca. 5 min bei Raumtemperatur getrocknet, in ein Eppendorf-Gefäß gegeben und in 500-1200  $\mu\text{l}$  TE-Puffer 10/1 (Anhang: Tab. A1, Volumen abhängig von der gefällten DNA-Menge) gelöst. Diese DNA-Lösung wird im Folgenden als Stammlösung bezeichnet.

Nach der Isolation der DNA wurde ein RNase-Verdau durchgeführt. Pro 100  $\mu\text{l}$  TE-Puffer 10/1 wurde 1  $\mu\text{l}$  RNase A (1 mg/ml) in die Stammlösung gegeben und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zuletzt wurde die DNA auf einem 1% Agarosegel auf Hochmolekularität getestet (siehe 3.3.2., Agarose-Gelelektrophorese).

Die Konzentrationsbestimmung der isolierten und gelösten DNA wurde fluorometrisch mit Hilfe eines DNA-Fluorometers (TKO 100, Hoefer Scientific Instruments) unter Verwendung des Farbstoffes Hoechst 33528 bestimmt; hierbei emittiert eine DNA-haltige Lösung nach Anregung mit einer Wellenlänge von 365 nm bei 460 nm eine Fluoreszenzlichtmenge, welche direkt mit dem DNA-Gehalt korreliert ist. Dazu wurde das Gerät anfangs mit einer Standardmenge Kalbsthymus-DNA geeicht, so dass die DNA-Konzentration in Anschluß direkt in ng/ $\mu\text{l}$  abgelesen werden konnte. Pro Messung wurden 2  $\mu\text{l}$  in TE-Puffer 10/1 gelöster DNA-Stammlösung mit 2 ml TNE/Fluoreszenz-Farbstoff-Lösung (Anhang, Tab. A2) versetzt; jede Messung wurde mindestens einmal wiederholt.

### **3.3.2. Gelbasierte DNA-(Fragment-)Analysen**

Die Auswahl der Trennmatrix für gel-basierte DNA-(Fragment-)Analysen richtet sich im Wesentlichen nach Art und Größenbereich bzw. Längenunterschieden der DNA. So wird für eine visuelle Kontrolle von extrahierter genomischer DNA, von restriktionsverdauter DNA und von PCR-Amplifikationen (RAPD- bzw. SCAR-Marker, AFLP-Präamplifikationen) standardmäßig die Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt; für die genaue Größenbestimmung von AFLP- und SSR-Produkten werden hochauflösende Polyacrylamid-Gele verwendet.

### *Agarose-Gelelektrophorese*

Zur Standard-Analyse von DNA-Fragmenten (5 µl DNA-Lösung mit 2,5 µl Bromphenolblau-Ladepuffer, Anhang: Tab. A3) wurden diese in horizontalen Gelelektrophorese-Kammern aufgetrennt (Sub-Cell GT, Bio-Rad, München, Größe 25 x 25 cm mit 2 x 51 Taschen). Die Agarose-Konzentrationen lagen bei 1% (genomische DNA; Größenstandard  $\lambda$  Hind III der Firma Invitrogen, Carlsbad, California) bzw. 2% (Restriktionsfragmente, PCR-Produkte; Größenstandard 100 bp-Leiter, Invitrogen) Anhang: Tab. A3. Als Laufpuffer diente 0,5 x TBE-Puffer (Anhang Tab. A3), die Trennstrecke betrug 5-10 cm bei einer Stromspannung von 4-6 V/cm. Nach Beendigung des Laufs wurden die Gele 15 min in einer Ethidiumbromid-Lösung (2 µg/ml) angefärbt. Überschüssige Färbe-Lösung wurde anschließend im Wasserbad entfernt (10 min). Die DNA-Fragmente wurden auf einem UV-Transilluminator bei 254 nm sichtbar gemacht und mittels einer Polaroid-Sofortbildkamera dokumentiert (Modell MP-4+, Polaroid GmbH, Offenbach).

### *Polyacrylamid-Gelelektrophorese auf automatischen Sequenziergeräte*

Die Auftrennung der AFLP- und SSR-Reaktionsprodukte erfolgte in einem denaturierenden Polyacrylamid-Gel (7% PAA, 10 x TBE-Long Ranger Puffer, 25 cm Länge, 0,2 mm Stärke; Größenstandard 50 - 700bp, MWG Biotech/Ebersberg, Anhang: Tab. A4). Die Verwendung eines automatischen Sequenzierers (LI-COR 4200, MWG-Biotech) mit Doppel-Laser System (700 nm bzw. 800 nm) erlaubte das gleichzeitige Auftrennen und Analysieren von Produkten aus zwei unterschiedlichen PCR-Reaktionen. Nach 90 s Hitzedenaturierung bei 94°C wurde 0,5 µl Amplifikationsansatz-Ladepuffermix (Amplifikationsansatz im Verhältnis 1:1 mit fuchsinhaltigem Formamid-Stop/Lade-Puffer gemischt, Anhang: Tab. A4) geladen und mit 1 x TBE<sub>Long Ranger</sub>-Puffer (Anhang: Tab. A4) als Laufpuffer bei 1800 Volt und 52°C für 120 min aufgetrennt. In der Regel konnte das Gel nach Beendigung des ersten Laufs noch ein zweites Mal mit neuen Proben beladen werden, so dass bei Verwendung eines 50 Taschen-Kamms (jeweils zwei Proben mit verschiedener Fluoreszenz-Markierung) im Optimalfall 192 Proben plus 8 Größenstandards pro Gel analysiert werden konnten.

### 3.3.3. PCR-Analysen

Für alle im weiteren beschriebenen PCR-Experimente wurden einen 'GeneAmp PCR-System 9600/9700' Thermocycler (Perkin Elmer Applied Biosystems, Darmstadt) verwendet; Volumina und Konzentrationen der verschiedenen Reaktionskomponenten, Reaktionstemperaturen und –zeiten sind im Anhang: (Tab. A5 bis A11) aufgeführt.

#### 3.3.3.1 AFLP-Analysen

Die AFLP-Analysen wurden mit Restriktionsverdau und Adapterligation unter Verwendung des AFLP® Core Reagent Kits der Firma Invitrogen angesetzt.

Die AFLP-Technik ist eine selektive PCR-Amplifikation von Restriktionsfragmenten, bei der Fragmente mit einer maximalen Länge von ca. 1000 bp zuverlässig amplifiziert werden können; hierfür sind folgende Schritte notwendig:

##### *Erste Schritte: Restriktionsverdau und Adapter-Ligation:*

Für den Restriktionverdau werden zwei Restriktionsenzyme verwendet, wobei das eine Restriktionsenzym mit einer Erkennungssequenz von sechs Basenpaaren statistisch eher selten (d.h. durchschnittlich einmal pro  $4^6 = 1/4096$  bp) schneiden sollte. Bei der *B. napus* Genomgröße von 1127 Mbp (Bennett und Leitch 1995, 2001) sind etwa 275000 Restriktionsstellen zu erwarten (hier verwendet: *EcoRI*, Erkennungssequenz 5'-G | AATTC-3').

Das andere Restriktionsenzym sollte mit einer Erkennungssequenz von vier Basenpaaren häufiger schneiden, nämlich durchschnittlich alle  $4^4 = 1/256$  bp. Im Fall von *B. napus* werden somit ca. 4402500 Restriktionsfragmente generiert (in dieser Arbeit eingesetzt: *MseI*, 5'-T | TAA-3'). Da in der Regel jedes der *EcoRI*-Fragmente im durchschnittlichen Abstand von 256 bp eine *MseI*-Schnittstelle aufweist, entstehen bei einem Doppelverdau mit beiden Enzymen pro *EcoRI*-Fragment zwei *EcoRI/MseI*-Fragmente, insgesamt also 550000. An den Enden der Restriktionsfragmente werden in der Adapter-Ligation doppelsträngige Adapter-Sequenzen anligiert (Anhang: Tab. A5), die neben den zu Restriktionsstellen komplementären Sequenzen weitere Basen enthalten, welche in ihrer Gesamtheit in den folgenden Amplifikationsschritten als Primerbindungsstellen dienen.

### *Zweiter Schritt: Präamplifikation*

In der '+1 Präamplifikation' wurde die zuvor geschnittene und mit Adaptern ligierte Raps-DNA mit Hilfe Adapter-spezifischer Primer amplifiziert. Neben den zu Adapter- und Restriktionsstellen-Sequenz komplementären Basen verfügen diese über ein zusätzliches, selektives Nukleotid am 3'-Ende (E+1/M+1, Anhang Tab. A5), um die Anzahl der in der PCR amplifizierten *EcoRI/MseI*-Fragmente pro selektivem Nukleotid zu vermindern. Geht man von den in der Doppelrestriktion erhaltenen 550000 *EcoRI/MseI*-Fragmenten aus, so werden mit zwei selektiven +1-Primern 1/16 aller Restriktionsfragmente (= ca. 34375) amplifiziert. Diese erste Amplifikation (+1 Präamplifikation) wird unter Verwendung einer 1:10 Verdünnung des Ligationsansatzes in TE-Puffer 10/0,1 (Anhang: Tab. A4) und des AFLP® Pre-amp Primer Mixes I (Invitrogen) durchgeführt.

### *Dritter Schritt: Selektive +3 Amplifikation*

Nach der 1:10-Verdünnung des Präamplifikationsansatzes folgte die abschließende +3-Amplifikation mit um jeweils zwei weitere selektive Basen verlängerten *EcoRI*- bzw. *MseI*-Primern (E+3, M+3; Anhang Tab. A5). Hierdurch werden von den ca. 34375 präamplifizierten Fragmenten wiederum pro Primer nur 1/16 (also 1/256) weiter amplifiziert. So werden bei Raps von den ca. 550000 *EcoRI/MseI*-Ausgangsfragmenten für jede *MseI*- und *EcoRI*-Primerkombination im Durchschnitt ca. 134 Amplifikationsprodukte erwartet. Um eine Fragmentanalyse mit Hilfe von Polyacrylamid-Gelen auf einem automatischen Sequenziergerät mit Doppel-Laser-System (LI-COR 4200; siehe 3.3.2) zu ermöglichen, werden in der selektiven Amplifikation mit spezifischen Fluoreszenz-Farbstoffen (IRD700, IRD800) markierte *EcoRI*-Primer eingesetzt, die durch Licht der Wellenlänge 700 nm bzw. 800 nm zur Fluoreszenz angeregt und mit Hilfe eines Photomultipliers detektiert werden können. So können die *Eco-MseI*-Fragmenten von den etwa 16-fach häufiger vorhandenen *Mse-MseI*-Fragmenten unterschieden werden.

Insgesamt 240 selektive AFLP-Primerkombinationen (Anhang: Tab. A5) wurden zur Identifikation von polymorphen Amplifikationsprodukten an den vier Eltern der beiden Kartierungspopulationen untersucht; davon wurden die 27 Primerkombinationen mit dem höchsten Polymorphiegrad für die genetische Kartierung verwendet (Anhang: Tab. 12).

Da 20 der 27 Primerkombinationen auch bei der Erstellung einer Raps-Kopplungskarte der Universität Göttingen verwendet wurden (Dr. W. Ecke, unveröffentlichte Ergebnisse), wurden die Göttinger Eltern-Linien - 'Mansholts Hamburger Raps (Gö1) und 'Samourai' (Gö2) - auf den Gelen mit den letztendlich ausgewählten Primerkombinationen mit aufgetragen (Abb. 5). Dadurch sollte ein Abgleich der Marker der ermittelten Kopplungsgruppen dieser Arbeit mit denen der Göttinger Karte ermöglicht werden.

Die jeweils eingesetzten Reaktionsparameter für sämtliche AFLP-Schritte (Volumina und Konzentrationen der verschiedene Reaktionskomponenten, Reaktionstemperaturen und Zeiten) sind im Anhang (Tab. A5-A8) aufgeführt.

### 3.3.3.2. SSR-Analysen

In einem Screening von 290 Mikrosatelliten-Primerpaaren (durchgeführt im Resistenzlabor der Saatenunion, Hovedissen), deren Zuordnung zu den *B. napus* Kopplungsgruppen bereits bekannt ist, wurden für die beiden Kartierungspopulationen 62 bzw. 73 zwischen den Kreuzungseltern polymorphe Mikrosatellitenmarker identifiziert und zur Verfügung gestellt. Hierbei gab es 26 SSR-Marker, die in beiden Populationen polymorph waren. Da oft mehr als ein Locus amplifiziert wird, mussten die jeweiligen Bandenmuster auch bei bekannter Kopplungsgruppe abgeglichen werden.

Daneben standen mindestens zwei weitere Mikrosatelliten-Marker pro *B. napus* Chromosom von verschiedenen *Brassica*-Arten zur Verfügung (insgesamt 60 SSR-Primerpaare), die aus der *Brassica*-DB (<http://ukcrop.net/perl/ace/search/BrassicaDB>) selektiert wurden (Anhang: Tab. A13). Diese 60 SSR-Primerpaare wurden in Gießen auf Polymorphismen zwischen den Kreuzungseltern beider Populationen untersucht.

Für die am Lehrstuhl für Pflanzenzüchtung durchgeführten SSR-PCR-Reaktionen wurde die Methode der M13-Primerverlängerung verwendet ('M13-tailed Primer', [http://www.licor.com/bio/App\\_514/App514.jsp](http://www.licor.com/bio/App_514/App514.jsp)), die von Oetting *et al.* (1995) entwickelt wurde, um durch Verwendung eines zusätzlichen, markierten Universalprimers die Analysekosten bei Fluoreszenz-markierten SSRs zu reduzieren.

Die Methode beruht auf der Verwendung von drei Primern pro Reaktion. Hierbei ist einer der beiden spezifischen Mikrosatelliten-Primer an seinem 5'-Ende um eine Sequenz des Bakteriophagen M13 verlängert ('getailt', Abb. 2A); zusätzlich wird ein

fluoreszenz-markierter Primer (in geringerer Konzentration) mit der Verlängerungs-M13-Sequenz eingesetzt (Abb. 2C). In den ersten Zyklen werden so PCR-Produkte erzeugt, die an einem Ende die M13-Basenabfolge enthalten (Abb. 2D). Hieran kann der fluoreszenz-markierte M13-Primer ansetzen und so (neben den nur verlängerten, unmarkierten SSR-Abschnitten) Fragmente erzeugen, (Abb. 2E, 2F), welche auf einem automatischen Sequenziergerät analysiert werden können (Schuelke, 2000).

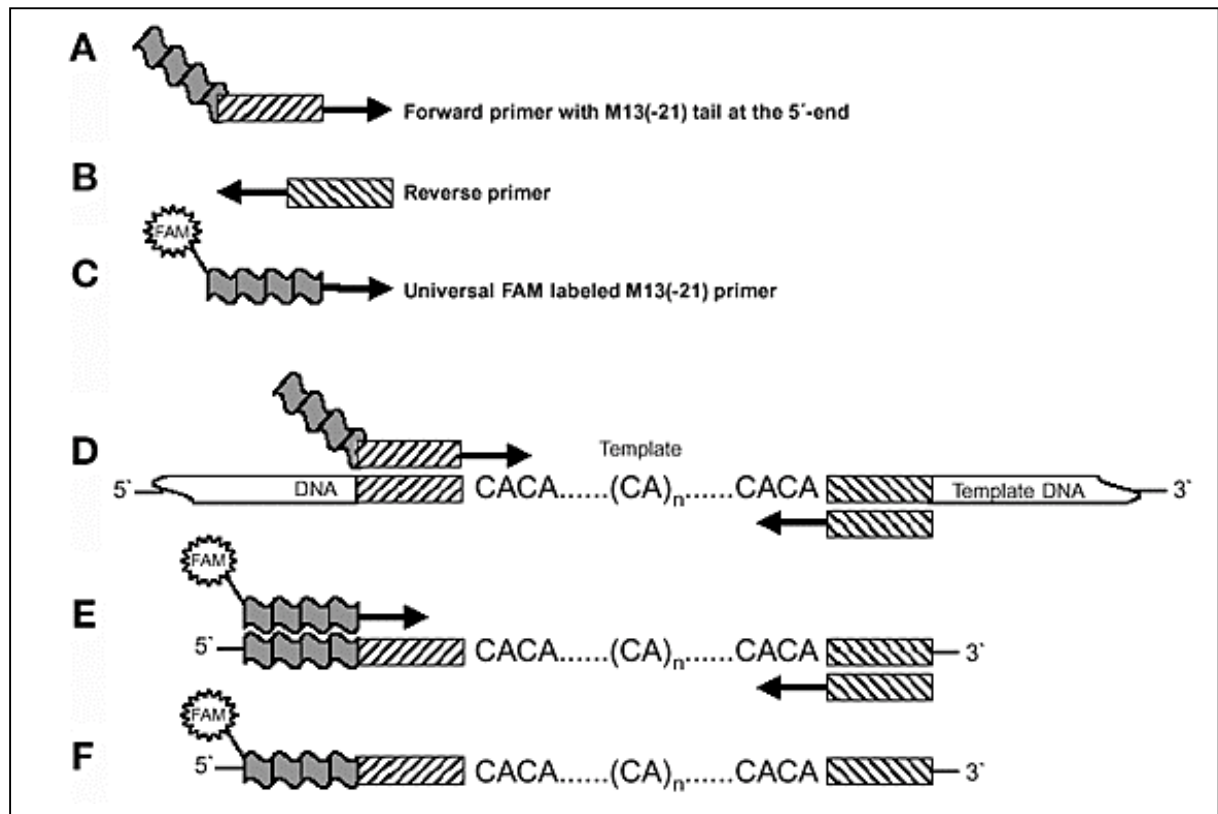


Abb. 2. Schema der Amplifikation in einer PCR-Reaktion (aus Schuelke, 2000).

In der vorliegende Arbeit wurden Mikrosatelliten-Primerpaare eingesetzt, bei denen der Vorwärtsprimer um einen 18 bp-Sequenz aus M13 (5'-TTTCCCAGTCACGACGTT-3') am 5'- 'Ende' verlängert war. Als dritter Primer wurde der IRD700- oder der IRD800-markierte Primer M13uniFi (5'- AGGGTTTTCCCAGTCACGACGTT-3') in der PCR-Reaktion verwendet. Die Fragmente, welche den fluoreszenz-markierten Primer M13uniFi aufweisend, konnten mit Hilfe des LI-COR 4200-Sequenziergerätes direkt detektiert werden (siehe 3.3.2.).

Die Zusammensetzung der PCR-Reaktionsgemische und die Thermocycler-Protokolle wurden für jedes Primer-Paar individuell optimiert und sind zusammengefasst dem Anhang: Tab. A9 zu entnehmen.

### 3.3.3.3. RAPD-Analysen

Das Prinzip der RAPD ist die PCR-Amplifikation von DNA-Abschnitten aufgrund zufälliger Sequenzübereinstimmungen zwischen meist 10 Nukleotiden langen Primern und der genomischen Vorlage-DNA. Neben diversen anderen Anwendungen wurden RAPDs bei Raps auch für die Lokalisierung von Markern für Gelbsamigkeit eingesetzt (Somers et. al. 2001). Die acht RAPD-Marker, von denen letztgenannte Autoren zeigen konnten, dass sie ein einzelnes Majorgen (*pigment1*) flankieren und somit als co-segregierende Marker für die gelbe Samenschalen-Farbe dienen können, standen auch hier zur Verfügung und wurden auf Polymorphismen zwischen den Kreuzungseltern der Populationen YE1 und YE2 untersucht.

Da die Reproduzierbarkeit und Übertragbarkeit von RAPDs als problematisch anzusehen ist, wurde in allen RAPD-Experimenten die Zusammensetzung der PCR-Reaktionsgemische sowie die entsprechenden Thermocycler-Programme direkt von Somers et. al. (2001) übernommen; ergänzend bzw. parallel wurde das am Institut Lehrstuhl für Pflanzenzüchtung, Gießen, verwendete RAPD-Standard-Protokoll sowie verschiedene Taq-Polymerasen eingesetzt. Die zugehörige, schließlich verwendete Haupt-Protokoll ist Tab. A10 im Anhang zu entnehmen.

Nach erfolgter RAPD-PCR wurden 5 µl des PCR-Ladepuffer-Mixes (RAPD-Produkte mit 2,5 µl Bromphenolblau-Ladepuffer gemischt, Tab. A3) auf 2% Agarose-Gele (siehe 3.3.2.) geladen und auf einer Laufstrecke von 10 cm bei 120 V (Elektrodenabstand 24 cm) aufgetrennt.

### 3.3.3.4. SCAR-Analysen

Die SCAR-Marker (*Sequence Characterized Amplified Region*), welche auf einzelnen, konvertierten AFLP-, RAPD- oder RFLP-Fragmenten mit Markereigenschaften beruhen, haben im Vergleich zu den oft multilocus-basierten Ausgangstechniken den Vorteil, dass nach Fragment-Isolation, Sequenzierung und Entwicklung von spezifischen Primerpaaren in der Regel nur ein kodominant auswertbares PCR-Produkt entsteht. Die dem entsprechend von Negi *et al.* (2000) aus einem dominanten AFLP-Marker-Fragment von *B. juncea* in einen kodominanten Marker konvertierte SCAR SCM08/WALK8F (mit Kopplung zur Samenschalenfarbe) wurde an den Kreuzungseltern der Populationen YE1 und YE2 auf Polymorphismen getestet.

Für die SCAR-Analysen wurden die im Anhang (Tab. A11) aufgelisteten Reaktionsbedingungen nach Negi *et al.* (2000) gewählt; dort sind auch die Primersequenzen zu finden.

### **3.3.4. Erstellung der genetischen Kopplungskarte**

Zur Erstellung der genetischen Kopplungskarten wurden zunächst für jedes AFLP-, SSR-, SCAR- und RAPD-Fragment die Genotypen der 110 DH-Linien und 179 F<sub>2</sub>-Individuen der Populationen YE1 und YE2 bestimmt. Jedes zwischen den Eltern der beiden Populationen polymorphe Fragment (Marker) wurde getrennt ausgewertet. In der F<sub>2</sub>-Population wurde die Dominanz bzw. Kodominanz der Marker berücksichtigt. Die so gewonnenen Daten dienten als Grundlage für die Analyse der genetischen Kopplung.

#### **3.3.4.1. Auswertung der PCR-Amplifikationsprodukte**

Kodominante Marker sind gegenüber dominanten Markern auf Grund ihres höheren Informationsgehaltes vorzuziehen. Ein kodominanter Marker erlaubt eine Unterscheidung zwischen homozygoten und heterozygoten Genotypen, dieses gilt für SSR- und SCAR-Marker. i.d.R. jedoch nicht für AFLP- und RAPD-Marker. Jansen *et al.* (2001) unterschieden zwischen dominant und kodominant auswertbaren AFLP-Markern, letztere basierend auf ihrer unterschiedlichen optischen Dichten (Intensität/Signalstärke bei homozygoten Individuen etwa doppelt so hoch wie bei Heterozygoten). Diese Unterscheidung wurde in der vorliegenden Arbeit bei der Erfassung der AFLP-Produkte soweit möglich angewendet.

Die Berechnung der Größen der zwischen den Eltern polymorphen Amplifikationsprodukte (in bp) wurde mit Hilfe des Programms RFLPScan™ durchgeführt (Scanalytics, Billerica/USA) und zur Charakterisierung der Markerbanden herangezogen, während die Fragmentgrößenbestimmung der Amplifikationsprodukte der Nachkommen in Anlehnung an die Eltern-Fragmente lediglich visuell durchgeführt wurde.



*YE1 : DH-Population*

In der homozygoten DH-Population wurde jedes zwischen den Eltern polymorphe Fragment als dominanter Marker ausgewertet. Die An- bzw. Abwesenheit eines Fragmentes wurde in zwei unabhängigen Wiederholungen als 'a'- bzw. 'b'-Werte dokumentiert. Individuen, die das Markerallel des Elters mit gelber Samenfarbe besaßen (Marker in Attraktion zum Merkmal gelbe Samenfarbe), erhielten ein 'b' zugeteilt, und Linien, die das Markerallel des schwarzsamigen Elters hatten (Marker in Repulsion zum Merkmal gelbe Samenfarbe), wurden mit 'a' bezeichnet. Nicht klar erkennbare oder unbekannte Fragmente wurden als '-' dokumentiert. Das Scoring dominanter Marker in DH-Individuen ist in der Abb. 3 beispielhaft dargestellt.

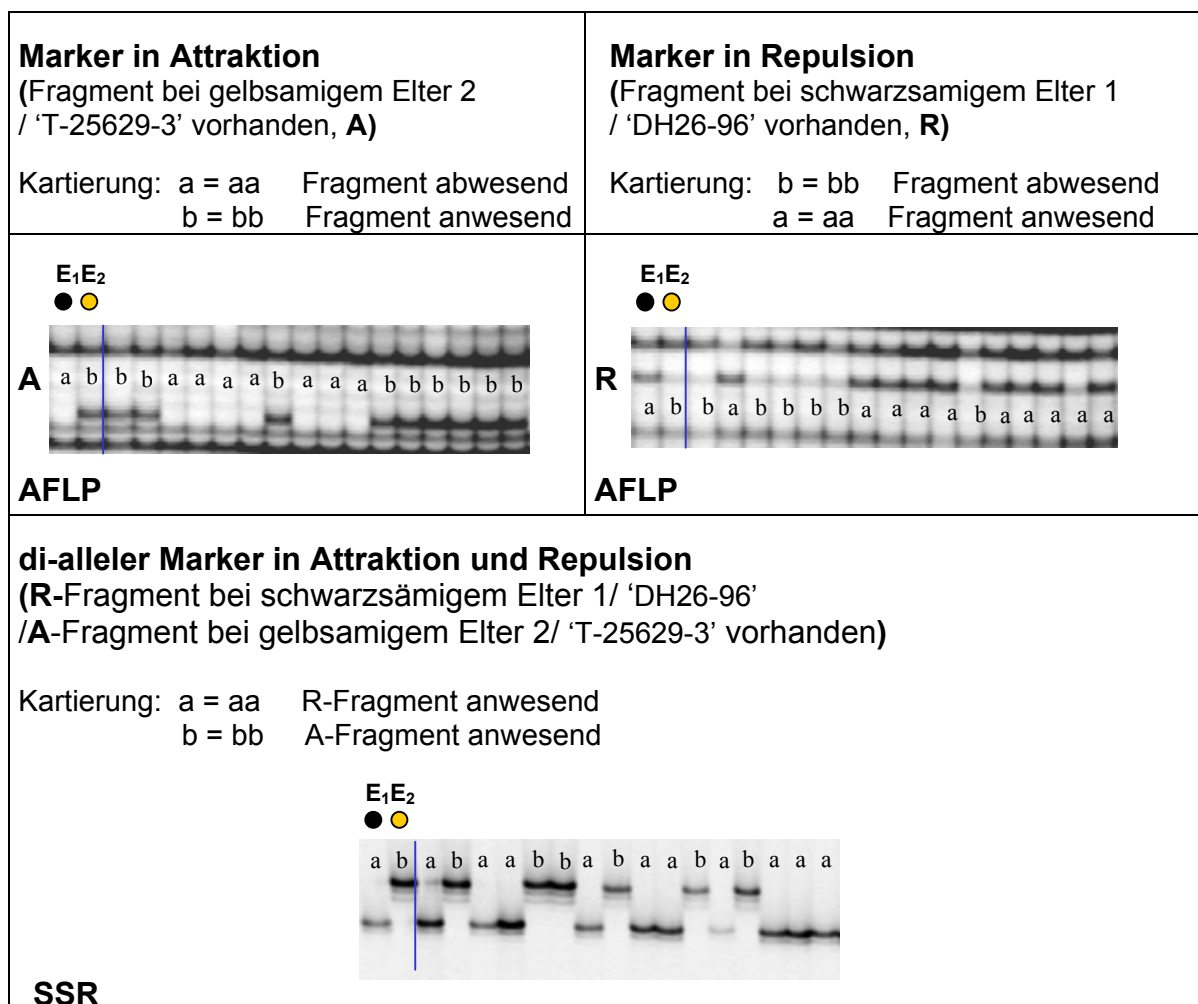


Abb. 3. Beispiel für die Auswertung eines dominanten Markers (z.B. SSR, SCAR, dominant auswertbares AFLP-Fragment) in der DH-Population YE1.

YE2 : F<sub>2</sub>– Population

In der heterozygote Individuen enthaltenden F<sub>2</sub>-Population wurden die zwischen den Eltern polymorphen Fragmenten als dominante und kodominante Marker getrennt ausgewertet. Die An- bzw. Abwesenheit und Intensität eines Fragmentes wurde in fünf unabhängigen Wiederholungen mit den Buchstaben 'a, c, d, b', und 'h' dokumentiert (Abb. 4a-c).

Die Genotypen, die als Zeichencode ermittelten wurden, wurden in einer Rohdaten-Datei gespeichert, welche als Eingabedatei für das Kartierungs-Programm MAPMAKER/EXP dient (siehe unten in 3.3.4.2, Wahrscheinlichkeit der Anordnung).

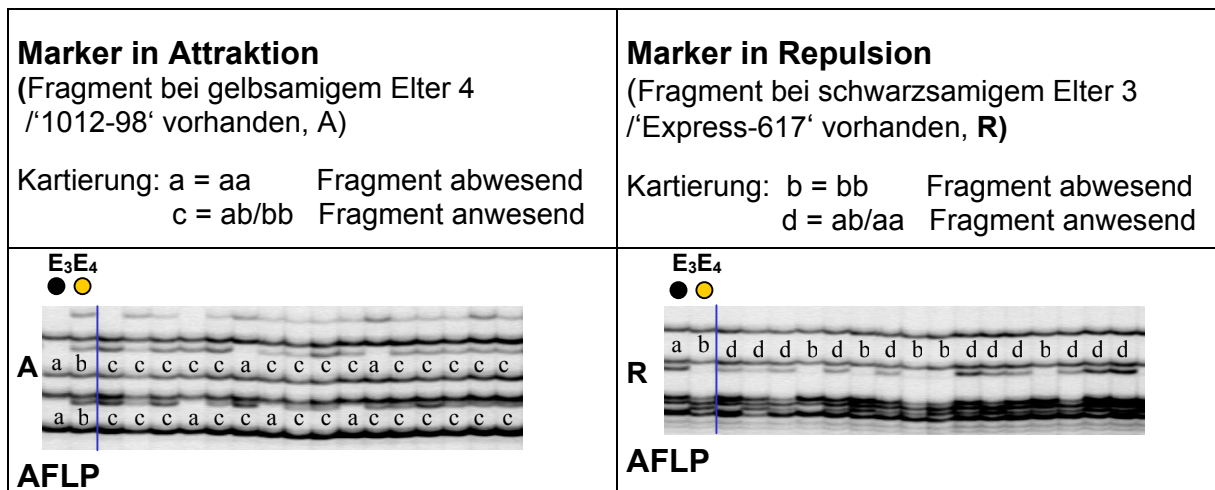


Abb. 4a. Beispiel für die Auswertung eines dominanten Markers (z.B. AFLP) in der F<sub>2</sub>-Population YE2.

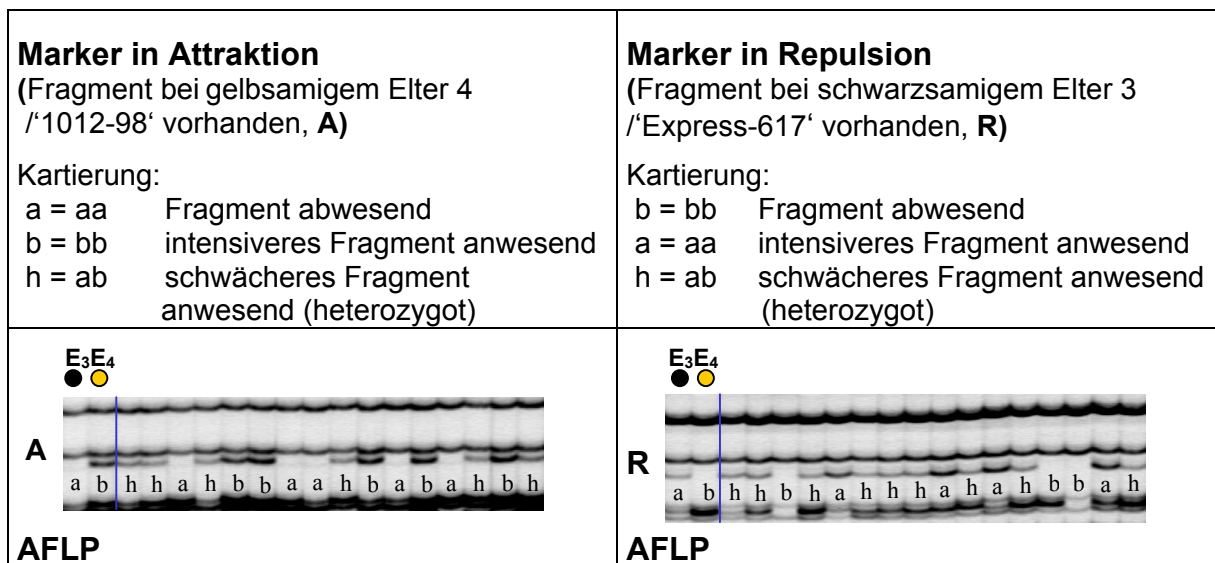


Abb. 4b. Beispiel für die Auswertung eines kodominanten Markers (Intensitätsunterschiede der Markerfragmente, z.B. AFLP) in der F<sub>2</sub>-Population YE2.

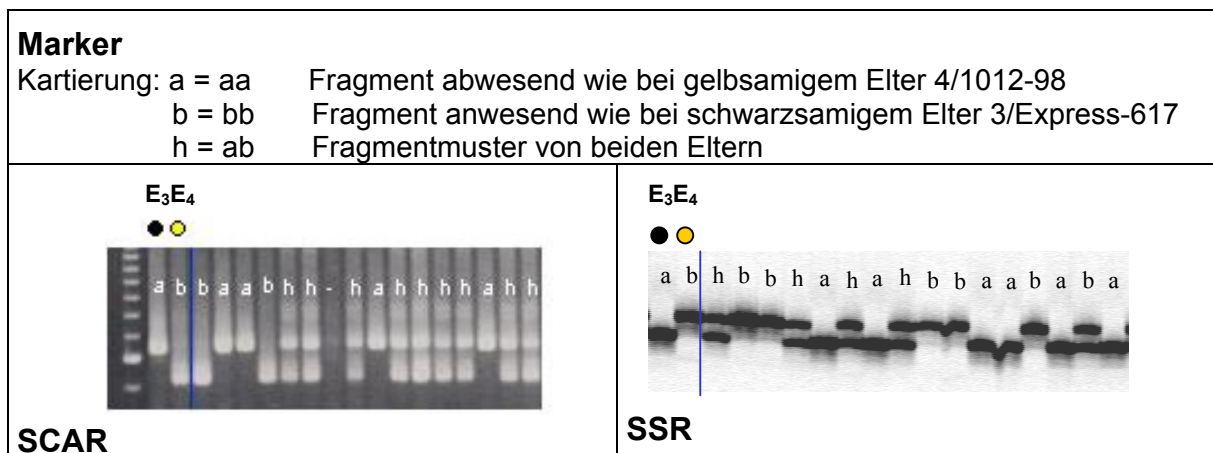


Abb. 4c. Beispiel für die Auswertung eines kodominanten Markers (di-allele Markerfragmente, z.B. SSR, SCAR) in der F<sub>2</sub>-Population YE2.

### 3.3.4.2. Genetische Kopplungsanalyse

Die Analyse der genetischen Kopplung besteht aus drei Teilen: (a) dem Test auf Kopplung (*linkage*) zwischen Markern oder Genen, (b) dem paarweisen Abschätzen der genetischen Distanz zwischen den Markern bzw. Genloci (*map distance* in cM), und (c) dem Bestimmen der Anordnung (*ordering*) mehrerer Marker bzw. Gene einer Kopplungsgruppe.

Im Test auf Kopplung zwischen zwei Markern/Genloci wird geprüft, ob die Zahl der Rekombinationsereignisse zwischen zwei Loci signifikant von rein zufälliger Rekombination abweicht. Für Loci, die auf verschiedenen Chromosomen liegen, also ungekoppelt vererbt werden, wird 50% Rekombination erwartet. Um Kopplung zu ermitteln, gibt es unter anderem die LOD-Methode (LOD = *logarithmic odds ratio*) nach Morton (1955), welche zwei Wahrscheinlichkeiten vergleicht: die Wahrscheinlichkeit, dass die beobachteten Daten gefunden werden, wenn die beiden Loci in der aus der Rekombinationsfrequenz errechneten Distanz liegen, und die Wahrscheinlichkeit, genau diese Daten zu erhalten, obwohl die Loci nicht gekoppelt wären. Der Logarithmus des Verhältnisses dieser beiden Wahrscheinlichkeiten wird als LOD-Wert bezeichnet. Ein LOD-Wert von 3 bedeutet eine Wahrscheinlichkeit von  $1/10^3$  dass zwei gegebene Loci nicht gekoppelt sind; Kopplung ist in diesem Fall also 1000-mal wahrscheinlicher als Nicht-Kopplung. Für die Ermittlung genetischer Kopplung wurden in MAPMAKER/EXP folgende Parameter verwendet: LOD 4.0, max. Markerabstand 38 cM.

Die geschätzte genetische Distanz in cM zwischen zwei Loci, die signifikante Kopplung zeigen, kann unter Berücksichtigung der Populationsstruktur direkt aus der Rekombinationsfrequenz (in Prozent) ermittelt werden. Zeigen z.B. zwei von 110 Linien Rekombination zwischen zwei Markern/Merkmalen, so beträgt ihr Abstand auf der Kopplungsgruppe 1,8 cM ( $2/110$  Linien zeigen Rekombination =  $0,0181$  [ $\times 100\%$  = 1,8%] = 1,8 cM). Bei Rekombinationsfrequenzen  $> 1/5$  (=20 cM) können andere Algorithmen zur Berechnung des Abstandes in cM hinzugezogen werden. Dazu gehören z.B. die nach Haldane (1919) ermittelten Doppelrekombinationen unter der Annahme, dass diese unabhängig voneinander vorkommen (keine Interferenz), oder der Algorithmus nach Kosambi (1944), der Interferenz zwischen Loci berücksichtigt.

Die Wahrscheinlichkeit der Anordnung von Markern einer Kopplungsgruppe wird aus den Abständen und Rekombinationsfrequenzen errechnet. Die Bestimmung der Kopplungsgruppen und die Reihenfolge der zugehörigen Marker in diesen Gruppen erfolgte ebenfalls mit dem Programm MAPMAKER/EXP (Lander *et al.*, 1987; Version 3.0b, 1990, *Whitehead Institute of Biomedical Research, Cambridge, USA*). MAPMAKER kann in der verwendeten DOS-Version nur mit den genetischen Modellen für  $F_2$ - und Rückkreuzungspopulationen rechnen. Da das genetische Modell einer DH-Population im entscheidenden Punkt, den zu erwartenden Spaltungsverhältnissen der verschiedenen Genotypen, mit einer Rückkreuzung übereinstimmt, kann eine DH-Population bei der Kopplungsanalyse wie eine Rückkreuzung behandelt werden (Uzunova 1994, Rudolf 2001). Folgende Parameter werden für die *ordering* von der Software festgelegt: LOD 3; max. Markerabstand 37,5 cM.

### **3.3.5. Kartenabgleich und Erstellung einer Konsensuskarte**

Selektierte AFLP-Primerkombinationen und SSR-Primerpaare wurden zur Identifikation von polymorphen Amplifikationsprodukten an den vier Eltern der beiden Kartierungspopulationen YE1 und YE2 getestet, um die genetischen Karten zu erstellen. Da 20 der 240 AFLP-Primerkombinationen auch bei der Erstellung einer Raps-Kopplungskarte der Universität Göttingen verwendet wurden (Dr. W. Ecke, unveröffentlichte Ergebnisse), wurden die Göttinger Eltern-Linien - 'Mansholts Hamburger Raps' (DH 11.4) und 'Samourai' (DH 5.1) - auf den Gelen mit den letztendlich ausgewählten Primerkombinationen mit aufgetragen (Abb. 5). Anhand von Markern, die in beiden Populationen kartiert wurden bzw. anhand von

Konsensusmarkern, deren chromosomale Zuordnung in der genetischen Karte der Universität Göttingen bereits bekannt war, wurden die Kopplungsgruppen der drei Populationen schließlich miteinander abgeglichen.

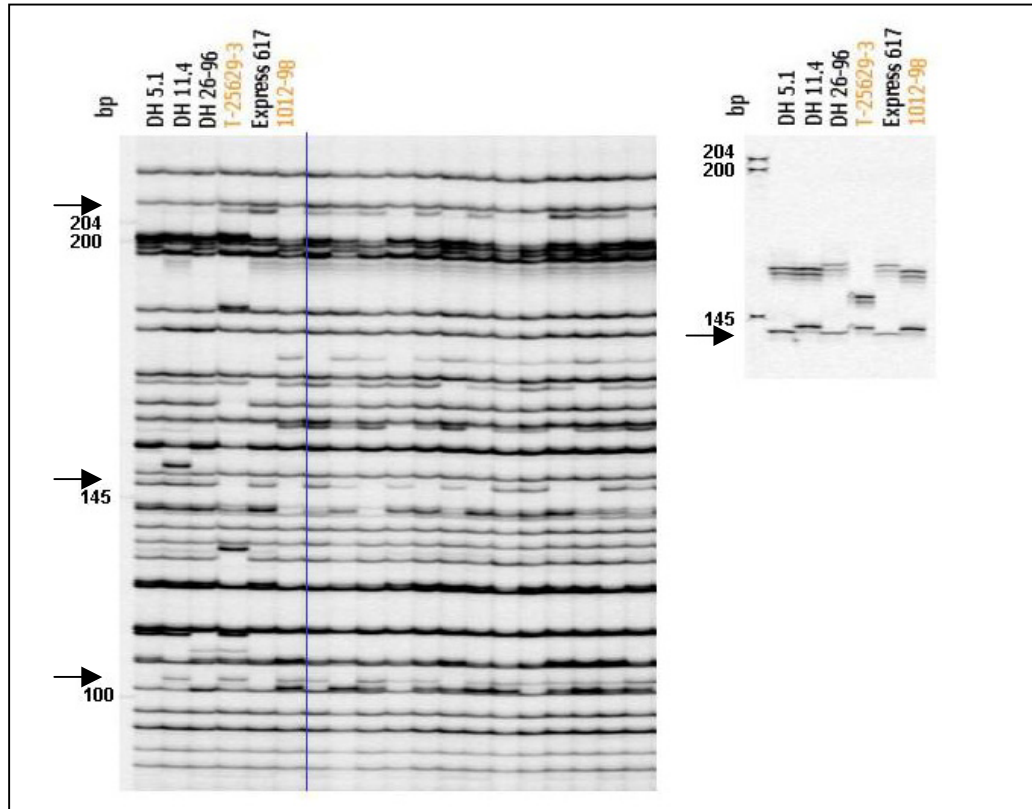


Abb. 5. Konsensusmarker in den Populationen YE1 (DH 26-96 x T-25629-3), YE2 (Express 617 x 1012-98) und 'Mansholts' (DH 11.4) x 'Samourai' (DH 5.1) der Universität Göttingen. Die mit einem Pfeil gekennzeichneten Marker sind in zwei bzw. drei der Populationen polymorph und konnten daraufhin für den Kartenabgleich herangezogen werden.

### 3.3.6. QTL-Analysen

Zur Durchführung der QTL-Analysen in beiden Kartierungspopulationen wurde das Programm PLABQTL Version 1.1 (Utz und Melchinger 2000) verwendet. Die in Excel erstellten Markerdaten wurde in einer \*.qdt Matrixdatei gespeichert, welche von PLABQTL als Eingabedatei benötigt wird; die Matrix enthält die Marker, die Kopplungsgruppe und phänotypische Daten. Als phänotypische Datengrundlage dienten jeweils die Samenfarben-Daten sowie Qualitätsmerkmale wie ADF-, Öl- und Protein-Gehalt. Bei der Population YE1 wurde der Mittelwert aus allen Wiederholungen und Umwelten verwendet. Durch das Editieren der \*.qin-Datei (Programcode) konnten die Parameter gesteuert werden, die für die Abfrage von QTL eingesetzt wurden.

PLABQTL führt eine Intervall-Kartierung durch (Lander und Botstein 1989), wobei zur Detektion der QTL der Ansatz der multiplen Regression mit flankierenden Markern (Haley und Knott 1992) unter Verwendung von Cofaktoren angewendet wird (*composite interval mapping*, CIM, Jansen und Stam 1994, Utz und Melchinger 1994, Zeng 1994). Die Auswahl der Marker, welche als Cofaktoren genutzt wurden, erfolgte anhand der Mittelwerte einer schrittweisen Regressionsanalyse. Mit anderen Worten basiert dieses Programm auf der Schätzung des Einflusses der einzelnen Genorte auf das Merkmal über einen multiplen Regressionsansatz.

Permutationstests ermöglichen die Festlegung von empirischen Werten für die Signifikanzschwellen von identifizierten QTL. In solchen Tests werden die Merkmalswerte zufällig unter den Nachkommen permutiert, so dass jede mögliche Beziehung zwischen den Merkmalswerten und den Genotypen der Marker-Loci aufgehoben wird. Die Regression für die permutierten Daten wird in allen Positionen im Genom angepasst und die maximale statistische Wahrscheinlichkeit (*likelihood ratio*) notiert. Dieses Verfahren wird hunderte oder tausende Male wiederholt (Churchill und Doerge, 1994; Doerge und Churchill, 1996). Im vorliegenden Fall wurden die Signifikanzen der ermittelten QTL durch 1000 Permutationen mit dem PLABQTL-Befehl 'Permute = 1000' berechnet.

Das Maximum der LOD-Kurve oberhalb des Schwellenwertes bezeichnet die Position des QTL in der genetischen Karte. Das PLABQTL-Resultat wird in einer \*.qpt-Datei ausgegeben (Plattform-unabhängige oder ASCII-Datei). Dabei wird die durch einen QTL erklärte phänotypische Varianz eines Merkmals, unabhängig von anderen QTL-Effekten, sowie die partielle phänotypische Varianz berechnet, die den Einfluss eines QTL unter Berücksichtigung des Einflusses aller anderen QTL bestimmt. In einer Varianzanalyse wird die durch alle identifizierten QTL erklärte genetische Varianz eines Merkmals unter Berücksichtigung von (QTL x Umwelt-)Interaktionen geschätzt. Das Bestimmtheitsmaß des Gesamtmodells entspricht der durch die jeweiligen QTL erklärten phänotypischen Varianz. Die Additiveffekt eines QTL wird als halbe Differenz zwischen den genotypischen Werten der homozygoten Eltern angegeben. Eine detaillierte Beschreibung der verwendeten mathematischen Funktionen findet sich bei Utz und Melchinger (2000).

## 4. ERGEBNISSE

### 4.1. Phänotypisierung

Die Phänotypisierungsdaten beinhalten die Ergebnisse der Charakterisierung der Samenfarbe von 118 DH-Linien aus der spaltenden Population YE1 in zwei Umwelten (Gewächshaus und Feld) sowie von 1394 F<sub>2</sub>-Individuen der Population YE2 (nur Feldmaterial) mit Hilfe des Bildauswertungssystems MARVIN. Zusätzlich wurden NIRS-Messungen der ADF-Gehalte von 80 der 105 für die Kartierung verwendeten Linien der Population YE1 sowie von 170 von 179 Kartierungsindividuen der Population YE2 durchgeführt; bei den restlichen Linien waren keine ausreichenden Samenmaterial-Mengen für Messungen vorhanden.

#### 4.1.1. Samenfarbe, ADF-Gehalt und assoziierte Qualitätsmerkmale

Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit lag auf der Phänotypisierung des Materials bezüglich Samenfarbe und ADF-Gehalt. Die Farbwerte für die Genotypen beider Populationen lagen zwischen 2,8 (helle Samen) und 9,0 (schwarze Samen) und die ADF-Gehalte zwischen 6,1 und 12,5 % TM.

Tab. 3. Samenfarbe, ADF-Gehalt und wertbestimmende Merkmale der Populationen YE1 und YE2.

Merkmal	Gewächshaus (GWH) und Feld	Population YE1				Population YE2			
		Mittelwert	Min. – Max.	P <sup>o</sup> -K	P <sup>o</sup> -S	Mittelwert	Min.–Max.	P <sup>o</sup> -K	P <sup>o</sup> -S
Samenfarbe (Farbwerte)	GWH	5,7	3,5–8,3	0,01	0,004	7,1	3,5–9,0	0,02	0,001
	Feld	6,2	2,8–8,9	0,04	0,07				
	GWH + Feld	6,0	3,2–8,5	0,00	0,003				
ADF-Gehalt (%TM)	GWH	8,2	6,2–11,6	0,00	0,00	9,9	8,1–12,5	0,00	0,00
	Feld	8,1	6,3–10,8	0,00	0,00				
	GWH + Feld	8,1	6,1–11,0	0,00	0,00				
Merkmal	Gewächshaus (GWH) + Feld				Feld				
	Mittelwert	Min.–Max.	P <sup>o</sup> -K	P <sup>o</sup> -S	Mittelwert	Min.–Max.	P <sup>o</sup> -K	P <sup>o</sup> -S	
TKG	3,8	1,9 – 5,5	0,02	0,13	4,4	1,7–8,8	0,01	0,00	
Proteingehalt (%TM)	28,5	24,9 – 31,7	0,20	0,77	22,0	15,5–26,1	0,20*	0,05	
Ölgehalt (%TM)	44,8	38,8 – 50,8	0,10	0,58	44,7	36,8–54,1	0,20*	0,05	

P<sup>o</sup>-K/ P<sup>o</sup>-S <0,05 zeigt eine signifikante Abweichung von einer Normalverteilung nach Kolmogoroff-Smirnov-Anpassungstest (P<sup>o</sup>-K) und Shapiro-Wilk-Anpassungstest (P<sup>o</sup>-S).

Die Häufigkeitsverteilungen der untersuchten Merkmale wurden mit dem Kolmogoroff-Smirnov-Anpassungstest ( $P^o$ -K) sowie Shapiro-Wilk-Test ( $P^o$ -S) auf Normalverteilung geprüft. In beiden Populationen wiesen die Verteilungen für Samenfarbe, ADF- und Protein-Gehalte eine signifikante Abweichung von einer Normalverteilung auf (Tab. 3). Für Öl- bzw. Protein-Gehalt wurde dagegen in beiden Populationen eine Normalverteilung festgestellt.

#### **4.1.2. Korrelationen zwischen Umwelten und Merkmalen in den Populationen YE1 und YE2**

Für alle untersuchten Merkmale (Samenfarbe, ADF-, Protein-, Öl-Gehalt, TKG) wurde in der Population YE1 eine positive Beziehung zwischen Feld- und Gewächshausdaten ermittelt (Tab. 4). Daher wurden die Daten aus den jeweils zwei Wiederholungen beider Umwelten gemittelt, um die Umweltabhängigkeit der Daten zu vergleichen bzw. zu relativieren. Für einen Vergleich der Korrelationen der Merkmale innerhalb bzw. zwischen den beiden Populationen (Tab. 4 bzw. 5) wurden für die Population YE1 nur die Mittelwerte verwendet.

Die Tab. 5 zeigt eine enge positive Korrelation zwischen ADF-Gehalt und Samenfarbe (YE1:  $r = 0,88^{**}$ , YE2:  $r = 0,74^{**}$ ); demnach besitzen helle Samen im Allgemeinen einen geringeren ADF-Gehalt, d.h. weniger Faser als schwarze Samen (Abb. 6). In der Population YE1 war der Proteingehalt negativ korreliert mit der Samenfarbe bzw. dem ADF-Gehalt (Tab. 5). Eine negative Korrelation zwischen diesen Merkmalen wurde auch in der Population YE2 erwartet; dort zeigte der Proteingehalt aber lediglich eine negative Korrelation mit dem ADF-Gehalt und keine Korrelation mit der Samenfarbe.

Zwischen Ölgehalt und Samenfarbe bzw. ADF-Gehalt bestand bei der Population YE1 keine Korrelation. Allerdings zeigte in der Population YE2 der Ölgehalt eine positive Korrelation sowohl mit der Samenfarbe als auch mit dem ADF-Gehalt (Tab. 5).



Tab. 4. Korrelationen zwischen TKG, Samenfarbe, ADF-Gehalt, Protein- und Ölgehalt (gemittelte Werte aus den beiden Umwelten Gewächshaus und Feld) in der Population YE1.

Merkmal		TKG		Samenfarbe		ADF-Gehalt (%TM)		Proteingehalt (%TM)		Ölgehalt (%TM)	
		GWH	Feld	GWH	Feld	GWH	Feld	GWH	Feld	GWH	Feld
TKG	GWH	1									
	Feld	0,29*	1								
Samenfarbe	GWH	0,17	0,12	1							
	Feld	0,07	0,44**	0,69**	1						
ADF-Gehalt (%TM)	GWH	0,19	0,01	0,87**	0,61**	1					
	Feld	0,05	0,01	0,77**	0,78**	0,73**	1				
Proteingehalt (%TM)	GWH	-0,19	-0,21	-0,32**	-0,29*	-0,32**	-0,29*	1			
	Feld	-0,08	-0,00	-0,23*	-0,29*	0,17	-0,39**	0,30**	1		
Ölgehalt (%TM)	GWH	0,11	0,04	0,02	-0,00	-0,12	-0,03	-0,51**	-0,27*	1	
	Feld	-0,02	-0,25*	-0,12	-0,08	-0,28*	-0,13	-0,08	-0,56**	0,47**	1

\* Die Korrelation ist auf dem 0,05 Niveau signifikant (zweiseitig)

\*\* Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig)

Tab. 5. Korrelation der Werte für TKG, Samenfarbe, ADF-, Protein- bzw. Öl-Gehalt sowie die Summe von Protein- und Öl-Gehalt in den Populationen YE1 und YE2.

Merkmal	TKG		Samenfarbe		ADF-Gehalt (%TM)		Protein-Gehalt (%TM)		Öl(-)Gehalt (%TM)		Öl+Protein-Gehalt (%TM)	
	YE1	YE2	YE1	YE2	YE1	YE2	YE1	YE2	YE1	YE2	YE1	YE2
TKG	1	1										
Samenfarbe	0,27*	0,14	1	1								
ADF-Gehalt (%TM)	0,10	-0,18*	0,88**	0,74**	1	1						
Protein-Gehalt (%TM)	-0,17	0,15	-0,38**	-0,04	-0,39**	-0,31**	1	1				
Öl-Gehalt (%TM)	0,15	0,09	-0,004	0,34**	-0,19	0,24**	-0,50**	-0,69**	1	1		
Öl+Protein-Gehalt (%TM)	0,08	0,27**	-0,23	0,43**	-0,45**	0,02	0,01	0,01	0,86**	0,70**	1	1

\* Die Korrelation ist auf dem 0,05 Niveau signifikant (zweiseitig)

\*\* Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig)

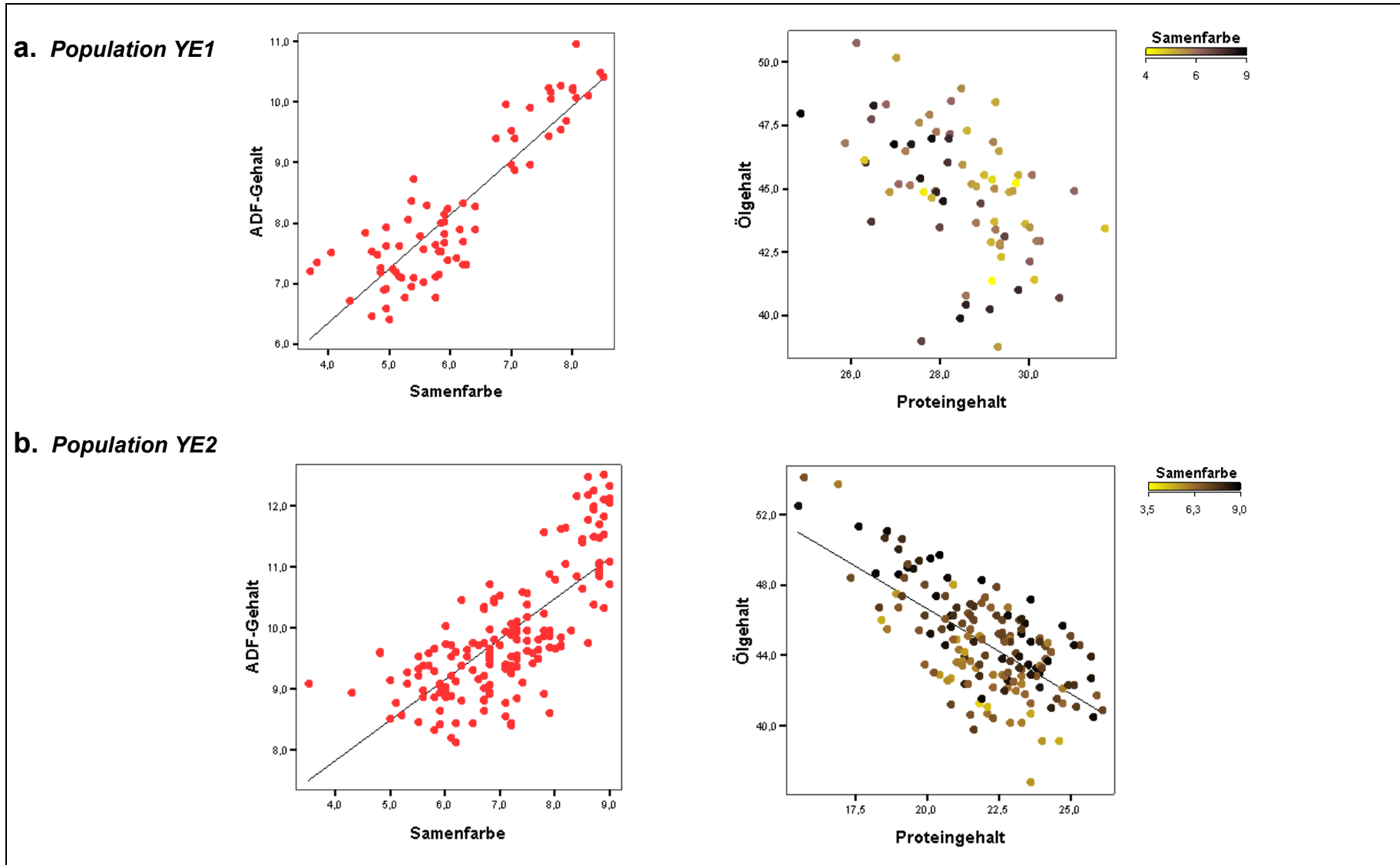


Abb. 6. Korrelationen zwischen ADF-Gehalt und Samenfarbe, Öl- bzw. Protein-Gehalt in den Populationen YE1 (a) und YE2 (b).

Wie erwartet waren Öl- und Proteingehalt in beiden Populationen negativ korreliert (YE1:  $r = -0,50^{**}$ , YE2:  $r = -0,69^{**}$ ; siehe Tab. 5, Abb. 6). Daher wurde als züchterisch relevantes Merkmal die Summe von Öl- plus Proteingehalt ermittelt und mit Samenfarbe bzw. ADF-Gehalt verglichen. Dabei besteht in der Population YE1 eine negative Korrelation mit dem ADF-Gehalt und keine signifikante Korrelation mit der Samenfarbe. Im Gegensatz dazu war in YE2 eine positive Korrelation zwischen Öl- plus Proteingehalt und Samenfarbe zu beobachten, während mit dem ADF-Gehalt keine signifikante Korrelation vorlag (Tab. 5).

In der Abb. 7 ist zu erkennen, dass die hellen Samen in beiden Populationen einen niedrigen Fasergehalt besitzen. Erwartungsgemäß wurde festgestellt, dass in der Population YE1 die Samen mit einem niedrigen Fasergehalt zu einem höheren Öl- plus Proteingehalt tendierten als die Samen mit einem höheren Faseranteil (Korrelation  $r = -0,45^{**}$ ). In der Population YE2 dagegen wurde diese Erwartung nicht erfüllt: Eine positive Korrelation ( $r = 0,43^{**}$ ) deutet an, dass dunklere Samen tendenziell einen höheren Öl- plus Proteingehalt aufweisen.

Wegen des beobachteten Zusammenhangs zwischen den Merkmalen Samenfarbe, ADF-, Öl- und Protein-Gehalt wurde auch eine Berechnung von partiellen Korrelationskoeffizienten durchgeführt. Damit konnten die Beziehungen zwischen mehreren Merkmalen errechnet werden, wobei die überlagernde Beziehung zu einem dritten oder zu weiteren Merkmalen ausgeschaltet bzw. die weiteren Merkmale konstant gehalten wurden.

Die Tabelle 6 zeigt die ermittelten partiellen Korrelationen für beide Populationen. Bei konstant gehaltener Samenfarbe wurden jeweils negative Korrelationen zwischen ADF-Gehalt und Öl- plus Proteingehalt (YE1:  $r = -0,55^{**}$ , YE2:  $r = -0,56^{**}$ ) und TKG (YE1:  $r = -0,31^{**}$ , YE2:  $r = -0,47^{**}$ ) gefunden. Dies wies darauf hin, dass Samen mit einem geringeren Faseranteil tendenziell mehr Öl und Protein enthalten; dieser Schluss folgt auch aus dem beobachteten höheren TKG bei niedrigem ADF-Gehalt.

Wurde anstelle der Samenfarbe der ADF-Gehalt bei der Berechnung der partiellen Korrelation nicht berücksichtigt, so wurden in beiden Populationen positive Korrelationen zwischen Samenfarbe und Öl- plus Proteingehalt (YE1:  $r = 0,41^{**}$ , YE2:  $r = 0,67^{**}$ ) bzw. TKG (YE1:  $r = 0,39^{**}$ , YE2:  $r = 0,46^{**}$ ) festgestellt.

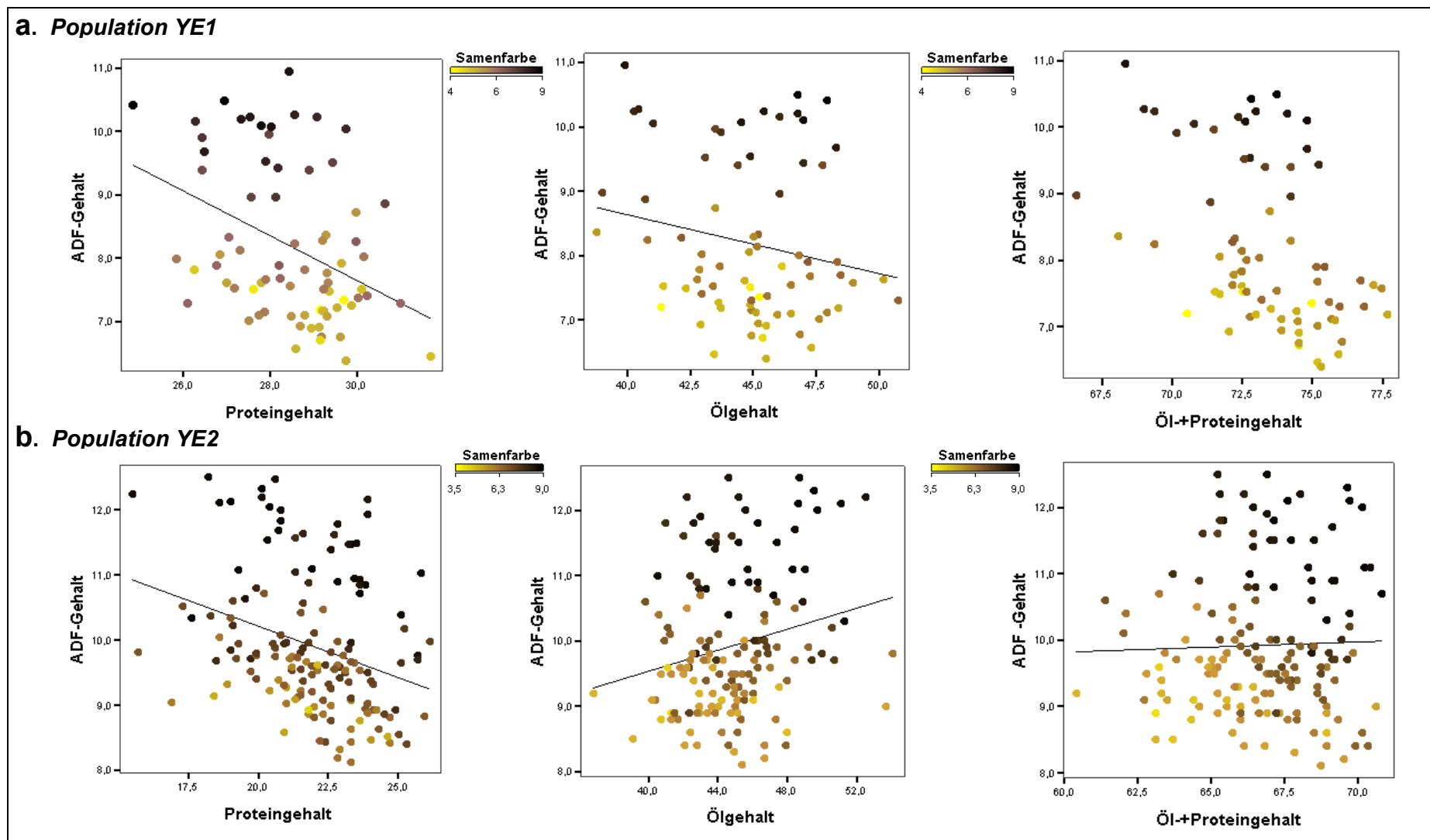


Abb. 7. Korrelationen zwischen ADF-Gehalt, Proteingehalt und kombiniertem Öl- plus Proteingehalt in den Populationen YE1 (a) und YE2 (b).

Tab. 6. Partielle Korrelationen zwischen Samenfarbe, ADF-Gehalt, TKG, Proteingehalt, Ölgehalt sowie kombiniertem Öl- plus Proteingehalt in den Populationen YE1 und YE2

Merkmal		TKG		ADF-Gehalt (% TM)		Proteingehalt (% TM)		Ölgehalt (% TM)		Öl+Proteingehalt	
		YE1	YE2	YE1	YE2	YE1	YE2	YE1	YE2	YE1	YE2
Samenfarbe	TKG	1	1								
	ADF-Gehalt(%TM)	-0,31**	-0,47**	1	1						
	Proteingehalt(% TM)	-0,06	0,16	-0,13	-0,42**	1	1				
	Ölgehalt(% TM)	0,16	0,07	-0,40**	-0,05	-0,54**	-0,73**	1	1		
	Öl+Proteingehalt	0,15	0,28**	-0,55**	-0,56**	-0,08	0,07	0,88**	0,64**	1	1
		TKG		Samenfarbe		Proteingehalt(% TM)		Ölgehalt(% TM)		Öl+Protein	
		YE1	YE2	YE1	YE2	YE1	YE2	YE1	YE2	YE1	YE2
ADF-Gehalt	TKG	1	1								
	Samenfarbe	0,39**	0,46**	1	1						
	Proteingehalt(% TM)	-0,13	0,10	-0,07	0,31**	1	1				
	Ölgehalt(% TM)	0,17	0,17*	0,36**	0,27**	-0,64**	-0,68**	1	1		
	Öl+Proteingehalt	0,14	0,32**	0,41**	0,67**	-0,19	0,05	0,88**	0,70**	1	1
		ADF-Gehalt(% TM)		Samenfarbe		Proteingehalt(% TM)		Ölgehalt(% TM)		Öl+Protein	
		YE1	YE2	YE1	YE2	YE1	YE2	YE1	YE2	YE1	YE2
TKG	ADF-Gehalt(%TM)	1	1								
	Samenfarbe	0,89**	0,79**	1	1						
	Proteingehalt(% TM)	-0,38**	-0,28**	-0,35**	-0,08	1	1				
	Ölgehalt(% TM)	-0,21	0,22*	-0,05	0,36**	-0,49**	-0,72**	1	1		
	Öl+Proteingehalt	-0,46**	0,04	-0,26*	0,43**	0,03	-0,03	0,86**	0,72**	1	1

\* Die Korrelation ist auf dem 0,05 Niveau signifikant (zweiseitig)

\*\* Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig).

Bei einer Nichtberücksichtigung des TKG wurde zwischen ADF und Samenfarbe eine enge positive Korrelation ermittelt (YE1:  $r = 0,89^{**}$ , YE2:  $r = 0,79^{**}$ ). Darüber hinaus war in YE1 die Samenfarbe mit dem Proteingehalt negativ korreliert ( $r = -0,35^{**}$ ). Helle Samen der Population YE1 enthielten somit tendenziell mehr Protein als dunklere Samen. In YE2 wurde dagegen bei Nichtberücksichtigung des TKG eine positive Korrelation zwischen Ölgehalt und Samenfarbe beobachtet ( $r = 0,36^{**}$ ). Dies bedeutet, dass in der Population YE2 dunklere Samen im allgemeinen einen höheren Gesamtanteil an Öl und Protein besitzen. Diese Beobachtung lässt sich damit erklären, dass der schwarzsamige Elter von YE2 – eine Linie aus der Sorte ‚Express‘ - im Gegensatz zu dem gelbsamigen Elter dieser Kreuzung einen hohen Ölgehalt besitzt; hieraus ergibt sich der hohe Ölgehalt schwarzer Samen. Gleichzeitig besteht die Möglichkeit, dass auch Samen mit hohen Tannin-Gehalten (und dadurch dunklen Schale) trotzdem einen geringen Rohfaseranteil aufweisen und somit einen höheren relativen Öl- plus Proteingehalt besitzen.

In allen drei getesteten Fällen (d.h. der Nichtberücksichtigung von Samenfarbe, ADF-Gehalt bzw. TKG) war bei den partiellen Korrelationen eine signifikante positive Korrelation zwischen Öl- und Öl- plus Proteingehalt, eine signifikante negative Korrelation zwischen Protein- und Ölgehalt, sowie keine nennenswerte Korrelation zwischen Protein- und Öl- plus Proteingehalt zu beobachten.

#### 4.1.3. Häufigkeitsverteilungen der Merkmale

Die Häufigkeitsverteilungen der beobachteten Werte für Samenfarbe und ADF-Gehalt wurden in 14 Klassen aufgeteilt, wie in Abb. 9 dargestellt. In allen Fällen wiesen die ermittelten Verteilungen zwei Gipfel auf. Da bezüglich der Samenfarbe (Abb. 9a) keine klare Unterscheidung zwischen den Phänotypen ‚gelbsamig‘ und ‚braunsamig‘ möglich war (Tab. 7), wurden den Beispielen von Somers *et al.* (2001) bzw. Liu *et al.* (2005a) folgend die gelben und braunen Phänotypenklassen zu einer Gruppe zusammengefasst und von den schwarzsamigen Genotypen unterschieden, um die Segregationsverhältnisse zwischen diesen beiden Gruppen (nicht-schwarz bzw. schwarz) zu überprüfen.

Wie in Abb. 9 zu sehen, überlappten die kontinuierlichen Verteilungen der schwarzen bzw. nicht-schwarzen Phänotypen, so dass in den meisten Fällen keine eindeutige

---

Abgrenzung der Klassen möglich war. Um die Klassentrennung für den Vergleich mit den in Tab. 7 ermittelten, erwarteten Häufigkeiten der schwarzen und nicht-schwarzen Phänotypen objektiv vorzunehmen, wurde eine Datensegmentationsprozedur verwendet. Dabei wurde für die einzelnen Verteilungen in einem sog. 'Moving-Window'-Verfahren der jeweilige Trennpunkt zwischen schwarzen und nicht-schwarzen Phänotypklassen anhand des maximalen  $t$ -Wertes der segmentierten Daten identifiziert. In allen Fällen befand sich dieser Trennpunkt jeweils in der kleinsten Phänotypklasse zwischen den beiden Verteilungsgipfeln. Das gleiche Verfahren wurde für eine Abgrenzung der Klassen in den zweigipfeligen ADF-Verteilungen vorgenommen (Anhang: Abb. A1)

Tab. 7. Vorschlag für ein genetisches Modell zur Vererbung der Samenfarbe und ADF-Gehalt nach Liu *et al.* (2005a) in Doppelhaploid- (DH) und F<sub>2</sub>-Nachkommen aus (a) der Kreuzung YE1 mit zwei spaltenden Loci und (b) der Kreuzung YE2 mit Spaltungen an drei Loci. Die Ergebnisse des Chi-Quadrat-Tests der beobachteten Spaltung von schwarzen zu nicht-schwarzen Samen in YE1 und YE2, verglichen mit der erwarteten Spaltung nach den entsprechenden bi- oder trigenischen Modellen, sind in Tab.7 aufgeführt.

YE1: Bigenisches Spaltungsmodell (zwei beobachtete QTL)		
Eltern	'T 25629-3'	'DH26-96'
Farbe	gelb	schwarz
Genotyp	YYbbcc	yyBBcc
F <sub>1</sub>	YyBbcc: gelb-braun	

DH	YYBBcc	YYbbcc	yybbcc	yyBBcc
Ratio	1	1	1	1
Farbe	gelb/braun	gelb	gelb/braun	schwarz
Erwartet	3 nicht-schwarz : 1 schwarz			

F <sub>2</sub>	Y-B-cc	Y-bbcc	yybbcc	yyB-cc
Ratio	9	3	1	3
Farbe	gelb/braun	gelb	gelb/braun	schwarz
Erwartet	13 nicht-schwarz : 3 schwarz			

YE1: Bigenisches Spaltungsmodell (zwei beobachtete QTL)		
Eltern	'T 25629-3'	'DH26-96'
ADF-Gehalt	reduziert	hoch
Genotyp	XXYYZZ	XxyyZZ
F <sub>1</sub>	XxYy ZZ: reduziert	

DH	XXYYZZ	XxyyZZ	XxYYZZ	XxyyZZ
Ratio	1	1	1	1
ADF-Gehalt	reduziert	reduziert	reduziert	hoch
Erwartet	3 ADF-reduziert: 1 ADF-hoch			

YE2: Trigenisches Spaltungsmodell (drei beobachtete QTL)		
Eltern	'Express 617'	'1012/98'
Farbe	schwarz	gelb
Genotyp	YYbbcc	yyBBCC
F <sub>1</sub>	YyBbCc: braun	

DH	YYBBCC	YYBBcc	YYbbCC	YYbbcc	yyBBCC	yyBBcc	yybbCC	yybbcc
Ratio	1	1	1	1	1	1	1	1
Farbe	braun	gelb/braun	gelb/braun	gelb	schwarz	schwarz	schwarz	gelb/braun
Erwartet	5 nicht-schwarz : 3 schwarz							

F <sub>2</sub>	Y-B-C-	Y-B-cc	Y-bbC-	yyB-C-	Y-bbcc	yyB-cc	yybbC-	yybbcc
Ratio	27	9	9	9	3	3	3	1
Farbe	braun	gelb/braun	gelb/braun	schwarz	gelb	schwarz	schwarz	gelb/braun
Erwartet	49 nicht-schwarz : 15 schwarz							

YE2: Trigenisches Spaltungsmodell (ein beobachteter QTL)		
Eltern	'Express 617'	'1012/98'
ADF-Gehalt	hoch	reduziert
Genotyp	XXyyzz	xxYYZZ
F <sub>1</sub>	YyBbCc: reduziert	

F <sub>2</sub>	X-Y-Z-	X-Y-zz	X-yyZ-	xxY-Z-	X-yyzz	xxY-zz	xyyZ-	xyyzz
Ratio	27	9	9	9	3	3	3	1
ADF-Gehalt	reduziert	reduziert	reduziert	reduziert	hoch	hoch	hoch	hoch
Erwartet	54 ADF-reduziert : 10 ADF-hoch							



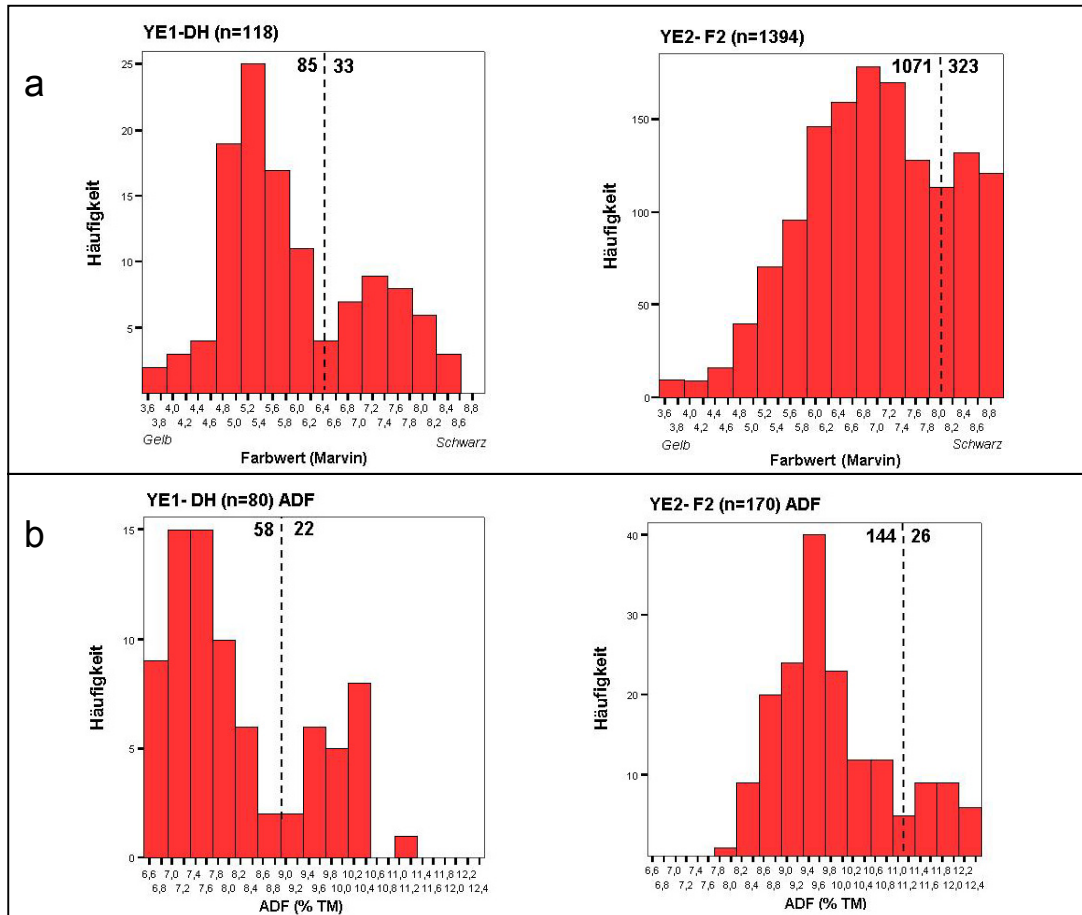


Abb. 9. Histogramme für (a) Samenfarbe und (b) ADF-Gehalt der DH-Population YE1 und der F<sub>2</sub>-Population YE2. Die vertikalen Linien stellen die Trennpunkte zwischen den jeweiligen Verteilungen dar (schwarz/nicht-schwarz bzw. hohe ADF-Gehalte/reduzierte ADF-Gehalte); die diese Linien flankierenden Zahlen sind die beobachteten Häufigkeiten der jeweiligen Phänotypklassen.

Die Histogramme in Abb. 9 zeigen die Spaltung für Samenfarbe und ADF-Gehalt in der DH-Population YE1 sowie der F<sub>2</sub>-Population YE2. Die Übereinstimmung der Spaltungsverhältnisse jeder Population mit der in Tab. 7 dargestellten, bei bigenischer bzw. trigenischer Vererbung erwarteten Spaltungen, wurde mittels Chi-Quadrat-Test getestet. Wie in Tab. 8a zu sehen, entsprechen die Spaltungsdaten der Kreuzung YE1 am besten einer bigenischen Vererbung ( $\chi^2=0,55$ ,  $p=0,457$ ,  $n=118$ ), während die entsprechenden Daten aus der F<sub>2</sub>-Population YE2 ( $\chi^2=0,06$ ,  $p=0,814$ ,  $n=1394$ ) bei hoher Signifikanz mit einer trigenischen Spaltung für Samenfarbe erklärbar sind.

Tab. 8a. Chi-Quadrat-Tests der erwarteten und beobachteten Spaltungsverhältnisse für schwarze gegenüber nicht-schwarzen Samen in den DH- und F<sub>3</sub>-Populationen der Kreuzungen YE1 bzw. YE2. Die Chi-Quadrat-Wahrscheinlichkeitswerte (p), die jeweils das Modell mit bester Übereinstimmung zu den beobachteten Daten darstellen, sind kursiv und fett markiert.

YE1	Samenfarbe	DH-Population (n = 118)			
		Beobachtet	Erwartet	$\chi^2$	p
<b>Bigenisches Modell</b>	nicht schwarz	85	88,5	0,55	<b><i>0,457</i></b>
	schwarz	33	29,5		
<b>Trigenisches Modell</b>	nicht schwarz	85	73,75	4,58	0,032
	schwarz	33	44,25		
YE2		F <sub>2</sub> -Population (n = 1394)			
		Beobachtet	Erwartet	$\chi^2$	p
<b>Bigenisches Modell</b>	nicht schwarz	1071	1132,6	17,88	0,000
	schwarz	323	261,4		
<b>Trigenisches Modell</b>	nicht schwarz	1071	1067,3	0,06	<b><i>0,814</i></b>
	schwarz	323	326,7		

Tab. 8b. Chi-Quadrat-Tests der erwarteten und beobachteten Spaltungsverhältnisse für ADF<sub>reduziert</sub>- gegenüber ADF<sub>hoch</sub>-Gehalt in den DH- und F<sub>3</sub>-Populationen der Kreuzungen YE1 bzw. YE2. Die Chi-Quadrat-Wahrscheinlichkeitswerte (p), die jeweils das Modell mit bester Übereinstimmung zu den beobachteten Daten darstellen, sind kursiv und fett markiert.

YE1	ADF-Gehalt	DH-Population (n = 80)			
		Beobachtet	Erwartet	$\chi^2$	p
<b>Bigenisches Modell</b>	ADF <sub>reduziert</sub>	58	60	0,27	<b><i>0,61</i></b>
	ADF <sub>hoch</sub>	22	20		
<b>Trigenisches Modell</b>	ADF <sub>reduziert</sub>	58	50	3,41	0,064
	ADF <sub>hoch</sub>	22	30		
YE2		F <sub>2</sub> -Population (n = 170)			
		Beobachtet	Erwartet	$\chi^2$	p
<b>Bigenisches Modell</b>	ADF <sub>reduziert</sub>	144	127,5	8,54	0,003
	ADF <sub>hoch</sub>	26	42,5		
<b>Trigenisches Modell</b>	ADF <sub>reduziert</sub>	144	143,4	0,001	<b><i>0,91</i></b>
	ADF <sub>hoch</sub>	26	26,6		

Bezüglich des ADF-Gehaltes war in beiden Kreuzungen eine Spaltung in zwei klar unterscheidbare Klassen sichtbar. In diesem Fall wurde für die beiden untersuchten Populationen jeweils die Spaltung von 'ADF<sub>reduziert</sub>' vs. 'ADF<sub>hoch</sub>' gegen die erwarteten Spaltungsverhältnisse für verschiedene Vererbungsmodelle getestet. Die Spaltung für einen reduzierten ADF-Gehalt in der DH-Population YE1 (Tab. 8a) entsprach am besten einem 3:1-Verhältnis ( $\chi^2= 0,27$ ,  $p=0,61$ ,  $n=80$ ). Diese Aufspaltung wäre in DH-Nachkommen bei der Wirkung zweier additiver, dominanter Genen zu erwarten, wenn die dominante Expression von einem oder von beiden Gen(en) einen reduzierten ADF-Gehalt bedingen würde (Tab.7).

In der YE2-F<sub>2</sub>-Population stimmten die beobachteten Daten dagegen sehr gut mit einer 54:10 Spaltung 'ADF<sub>reduziert</sub>' vs. 'ADF<sub>hoch</sub>' überein ( $\chi^2= 0,001$ ,  $p=0,91$ ,  $n=170$ ; vgl. Tab 8b). Dies wäre mit einer Vererbung durch drei additive, dominante Gene zu erklären, wenn die Ausprägung von mindestens zwei oder drei dieser Gene eine Verringerung des ADF-Gehaltes bewirken würde. Dieses Modell könnte auch die beobachtete Spaltung bei YE1 erklären, falls eines der drei Gene in dieser Kreuzung nicht spaltend und dominant wäre (Tab.7).

#### **4.2. Genetische Kartierung von YE1 bzw. YE2**

Für die Erstellung von Genomkarten der Kreuzungen YE1 und YE2 wurden in erster Linie 27 AFLP-Primerkombinationen verwendet. Weiterhin wurden in YE1 25 polymorphe SSR-Primerpaare und in YE2 18 polymorphe SSR-Primerkombinationen eingesetzt, welche aus den 60 öffentlich verfügbaren SSR-Primerpaaren ([www.brassica.info/ssr/SSRinfo.htm](http://www.brassica.info/ssr/SSRinfo.htm); Anhang: Tab: A13) als polymorph zwischen den jeweiligen Eltern der Kartierungspopulationen selektiert worden waren. Zusätzlich wurden für die genetische Kartierung 68 weitere (nicht öffentlich verfügbare) SSR-Primerkombinationen durch das Resistenzlabor der Saaten-Union, Hovedissen, zur Verfügung gestellt. Aus diesen Primerkombinationen zeigten 34 mindestens einen Polymorphismus zwischen den YE1-Kreuzungseltern, und 53 ergaben nutzbare Polymorphismen zwischen den YE2-Kreuzungseltern. Von den acht RAPD-Primern und zwei SCAR-Primerpaaren erwiesen sich zwei bzw. keiner als polymorph für YE1, für YE2 waren es jeweils einer bzw. eines.

Anhand von AFLP-Konsensus-Markern aus der ‚Mansholts‘ x ‚Samourai‘-Karte der Universität Göttingen, deren chromosomale Zuordnung bereits bekannt war, wurden die Kopplungsgruppen der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Populationen YE1-DH und YE2-F<sub>2</sub> miteinander und mit den Göttinger Kopplungsgruppen abgeglichen.

#### 4.2.1. Genetische Karte von YE1

Für die Erstellung der Genomkarte für die Kreuzung YE1 wurden in 105 DH-Linien 269 polymorphe AFLP-Fragmente detektiert. Weiterhin wurden durch 64 SSR-Primerpaare 61 polymorphe Loci nachgewiesen. Aufgrund fehlender Polymorphismen bzw. schlechter Auswertbarkeit konnten keine RAPD- und SCAR-Marker in die Karte integriert werden.

Insgesamt gingen 333 Marker in die Kartierung mit Hilfe des Programmes Mapmaker 3.0 ein. In der resultierenden genetischen Karte (Abb. 10) mit einer Gesamtgröße von 1319,9 cM und 22 Kopplungsgruppen sind insgesamt 196 Marker enthalten (165 AFLP- und 32 SSR-Marker), davon sind 35 kosegregierend. Die durchschnittliche Größe der Kopplungsgruppen liegt bei 59,9 cM; dies entspricht durchschnittlich einem Markerabstand von 6,8 cM bei 9 Markern pro Kopplungsgruppe. Die mit 123,6 cM größte Kopplungsgruppe besteht aus 10 AFLP- und 3 SSR-Markern, wohingegen sechs Kopplungsgruppen nur zwei Marker mit einer Rekombinationsfrequenz von 0 bis 9,7 cM aufweisen. Da das *B. napus*-Genom aus 19 Chromosomen besteht, ist davon auszugehen, dass noch Lücken in dieser genetischen Karte vorliegen; durch die Kartierung weiterer Marker dürfte eine Anlagerung der kleineren Gruppen an andere Gruppen und dadurch eine Reduktion auf 19 Kopplungsgruppen erreicht werden. Die größte Rekombinationsfrequenz von 47,8 cM tritt im Markerintervall ‚AFLP-C16\_7/AFLP-P13\_2A‘ der Kopplungsgruppe 13 auf. In 18 der 22 Kopplungsgruppen befinden sich SSR-Marker. Insgesamt konnten pro Kopplungsgruppe bis zu vier SSR-Marker kartiert werden; bei den AFLP-Markern wurden zwischen 1 und 24 Marker pro Kopplungsgruppe kartiert.

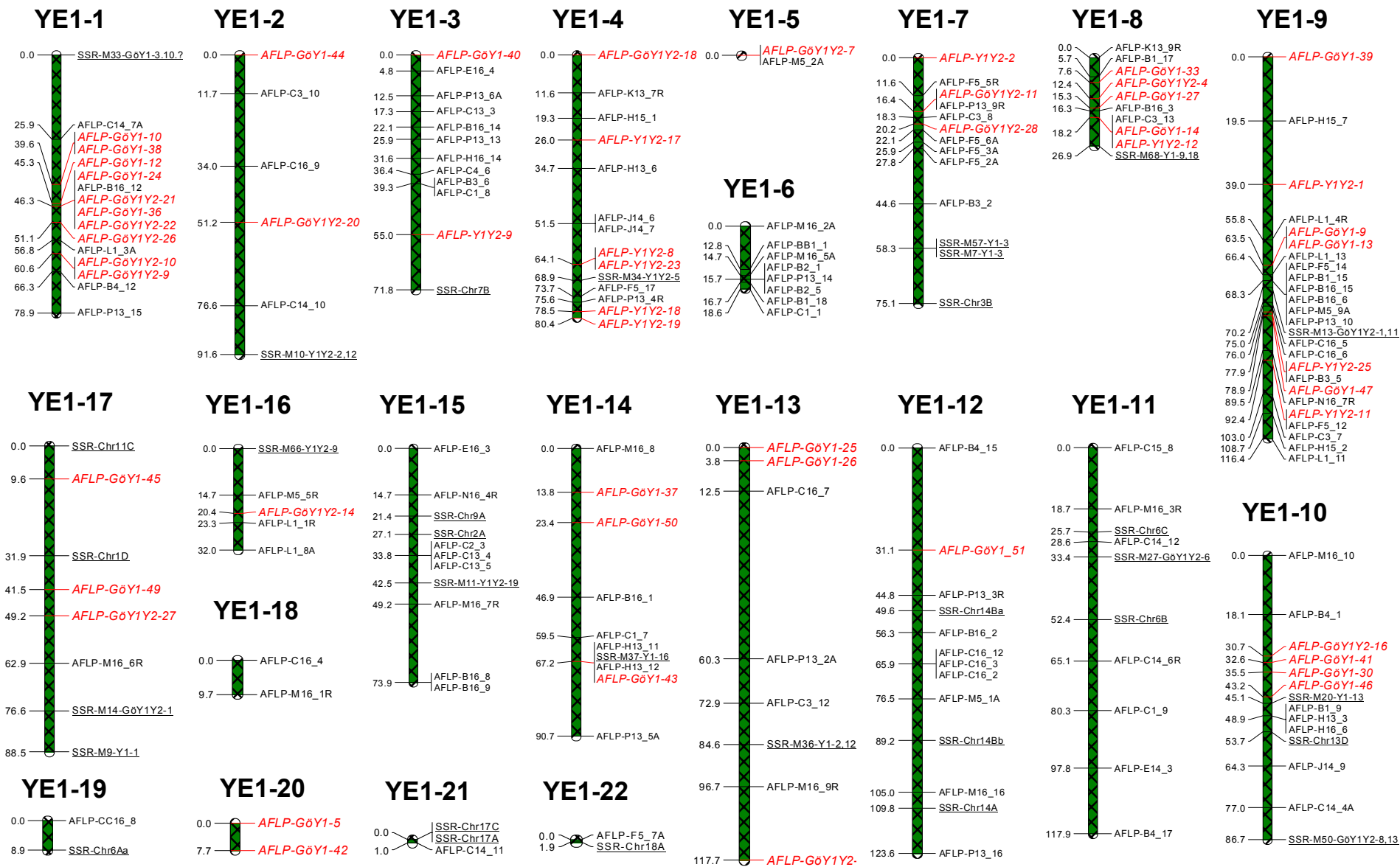


Abb. 10. AFLP/SSR-Kopplungskarte der Population YE1. Marker mit fettgedruckter Farbe sind Konsensusmarker zwischen zwei oder drei Populationen (GöY1, GöY2, GöY1Y2 und Y1Y2), SSR-Marker sind unterstrichen (Markerbezeichnungen: Y1=YE1, Y2=YE2) ; Kodierungskürzel der Marker siehe Tabellen A5 und A13.

#### 4.2.2. Genetische YE2-Karte

In der F<sub>2</sub>-Population der Kreuzung YE2 wurden anhand von 179 Individuen insgesamt 336 polymorphe Marker detektiert, nämlich 241 AFLP-Fragmente aus 27 Primerkombinationen, 94 SSR-Loci aus 71 Primerpaaren und ein SCAR-Locus.

Wie bereits bei der DH-Population der Kreuzung YE1 wurden 21 Kopplungsgruppen berechnet, die in diesem Fall 194 AFLP- und 58 SSR-Marker enthalten (Abb. 11); Kosegregation wurde nicht beobachtet. Von den 194 kartierten AFLP-Markern konnten 155 (ca. 80%) kodominant ausgewertet werden. Bei einer Gesamtgröße von 2953 cM beträgt der durchschnittliche Markerabstand 8,9 cM, die durchschnittliche Größe einer Kopplungsgruppe 134,2 cM und die Markerdichte 16 Marker pro Chromosom. Zwei der 21 Kopplungsgruppen zeigen eine sehr hohe Gesamtrekombinationsfrequenz (445,4 cM bzw. 455,7 cM), sie bestehen aus 32 bzw. 30 AFLP-Markern und 8 bzw. 13 SSR-Markern. Die kleinste Kopplungsgruppe mit 3,2 cM besteht aus nur einem AFLP- und einem SSR-Marker. Mit Ausnahme der beiden größten Gruppen liegen die Rekombinationsfrequenzen zwischen 58,5 (Kopplungsgruppe 18) und 1,6 cM (Kopplungsgruppe 17). Für 19 Kopplungsgruppen wurden SSR-Marker detektiert, insgesamt konnten pro Kopplungsgruppe bis zu 13 SSR-Loci kartiert werden. Bei den AFLP-Markern waren es zwischen 1 und 32 pro Kopplungsgruppe.

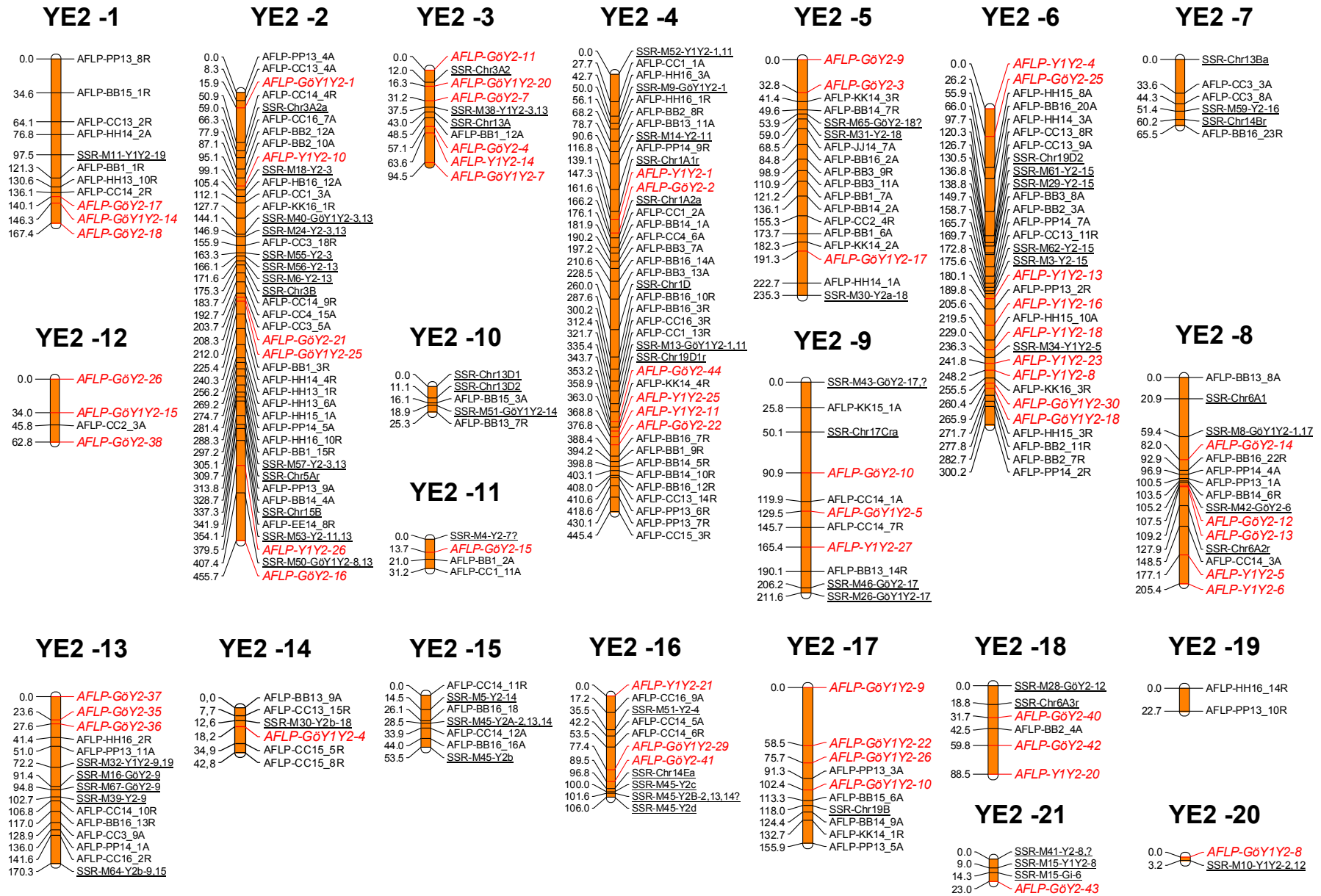


Abb. 11. AFLP/SSR-Kopplungskarte der Population YE2. Marker in roter Farbe sind Konsensusmarker zwischen zwei oder drei Populationen (GöY1, GöY2, GöY1Y2 und Y1Y2), unterstrichene Marker sind kartierte SSR-Marker; Kodierungskürzel der Marker s. Tab. A5, A13.

#### 4.2.3. Kartenabgleich: Konsensuskarte YE1 und YE2

Aufgrund der Verwendung von 20 AFLP-Primerkombinationen, die bereits in der Göttinger Kreuzung ‚Mansholts‘ x ‚Samourai‘ eingesetzt worden waren (Dr. W. Ecke, unveröffentlichte Ergebnisse), konnten bei der Entwicklung der Karten für die Kreuzungen YE1 (Y1) und YE2 (Y2) gemeinsame polymorphe Fragmente als Konsensusmarker detektiert werden (Tab. 9).

Tab. 9. Jeweilige Anzahl der AFLP-Konsensusmarker, die in den Karten für die Kreuzungen YE1 (Y1), YE2 (Y2) bzw. ‚Mansholts‘ x ‚Samourai‘ (Gö) colokalisierten und somit für den Kartenabgleich zur Verfügung standen.

AFLP-Konsensusmarker	Zahl der Konsensusmarker AFLP/SSR	Zahl der kartierten Marker in Y1 AFLP/SSR	Zahl der kartierten Marker in Y2 AFLP/SSR	Gemeinsame Marker in Genomkarte Y1 und Y2 AFLP/SSR	
				Y1	Y2
Y1Y2	25/ 14	10/ 4	17/ 7	7/ 2	7/ 2
GöY1	30/ 3	25/ 1	-	21/ 1	-
GöY2	47/ 9	-	27/ 7	-	15/ 7
GöY1Y2	30/ 9	15/ 4	17/ 7	9/ 2	9/ 2
Gesamt	132/ 35	50/ 9	61/ 21	44/10	42/ 11

Durch einen Vergleich der Markerdaten aus den Karten für YE1, YE2 und ‚Mansholts x Samourai‘ mit der öffentlich verfügbaren SSR-Karte des BBSRC (<http://ukcrop.net/perl/ace/search/BrassicaDB>) konnte die Kopplungsgruppenzuordnung weiter verbessert werden. Hierbei handelt es sich um gemeinsame Marker mindestens zweier genetischer Karten, womit eine Zuordnung von Kopplungsgruppen zwischen den verschiedenen Kartierungspopulationen anhand der BBSRC-Karte mit der standardisierten Chromosomennomenklatur von Sharpe *et al.* (1995), Parkin *et al.* (1995) bzw. Osborn *et al.* (1997) möglich war. Für 14 Kopplungsgruppen der Population YE1 und 16 der Population YE2 wurde die AFLP-Karte der Kreuzung ‚Mansholts‘ x ‚Samourai‘ (Dr. W. Ecke, unveröffentlichte Ergebnisse) als Brücke verwendet. In Abb. 12 ist dies beispielhaft für eine Kopplungsgruppe dargestellt.

Von 132 AFLP- und 35 SSR-Konsensusmarkern zwischen zwei oder drei Populationen (Y1Y2, GöY1Y2, GöY1, GöY2) wurden 50 AFLP- und 9 SSR- in der Population YE1 und 61 AFLP- sowie 21 SSR-Konsensusmarker in der Population YE2 kartiert (z.B. *AFLP-Y1Y2-12* und *SSR-M10-Y1Y2-2,12* in Abb. 13).



Anhand der Identifikation von drei gemeinsamen Markern in den Karten für YE1, YE2 und 'Mansholts' x 'Samourai', einem gemeinsamen Marker zwischen den Karten für YE1 und YE2, sowie drei gemeinsamen Markern zwischen den Karten für 'Mansholts' x 'Samourai' und YE2 konnten insgesamt 14 der 20 Kopplungsgruppen in der Konsensuskarte den entsprechenden Kopplungsgruppen der 'Mansholts' x 'Samourai' Karte eindeutig zugewiesen werden.

Da die Kopplungsgruppen der Göttinger Karte bereits über RFLP-Marker mit der internationalen Standardnomenklatur abgeglichen wurden (Dr. W. Ecke, pers. Mitt.), konnten schließlich 17 der Kopplungsgruppen in der Konsensuskarte YE1–YE2 eindeutig identifiziert werden (vgl. Abb. 12).

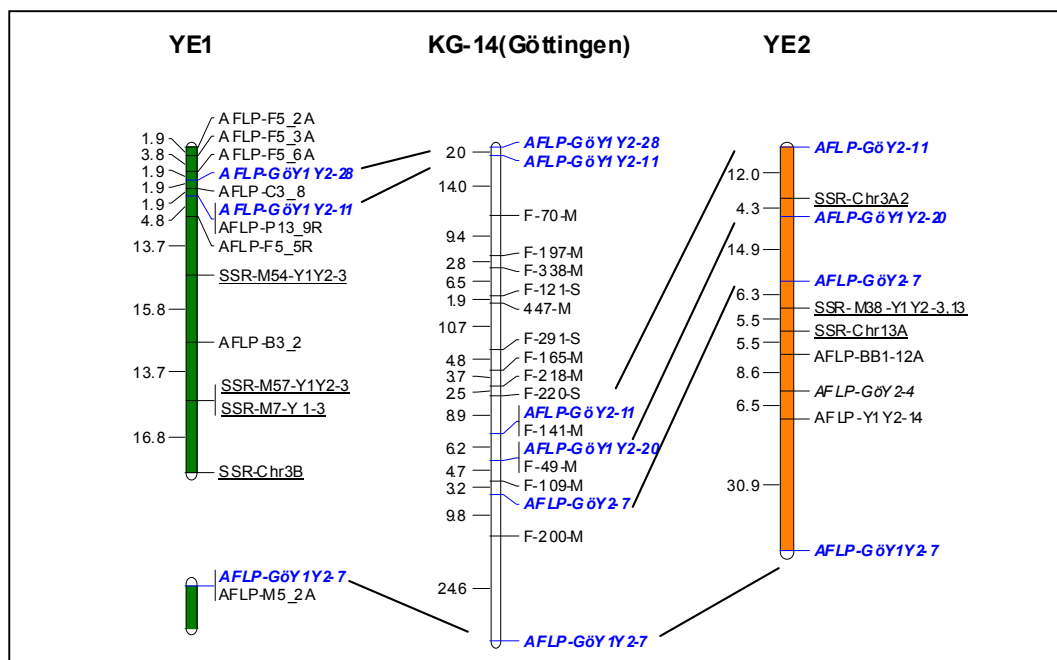


Abb. 12. Beispiel für den Abgleich der Kopplungsgruppen von YE1 und YE2 unter Verwendung der 'Mansholts x Samourai'-AFLP-Karte der Universität Göttingen als Brücke; Kodierungskürzel der Marker siehe Tabellen A5 und A13.

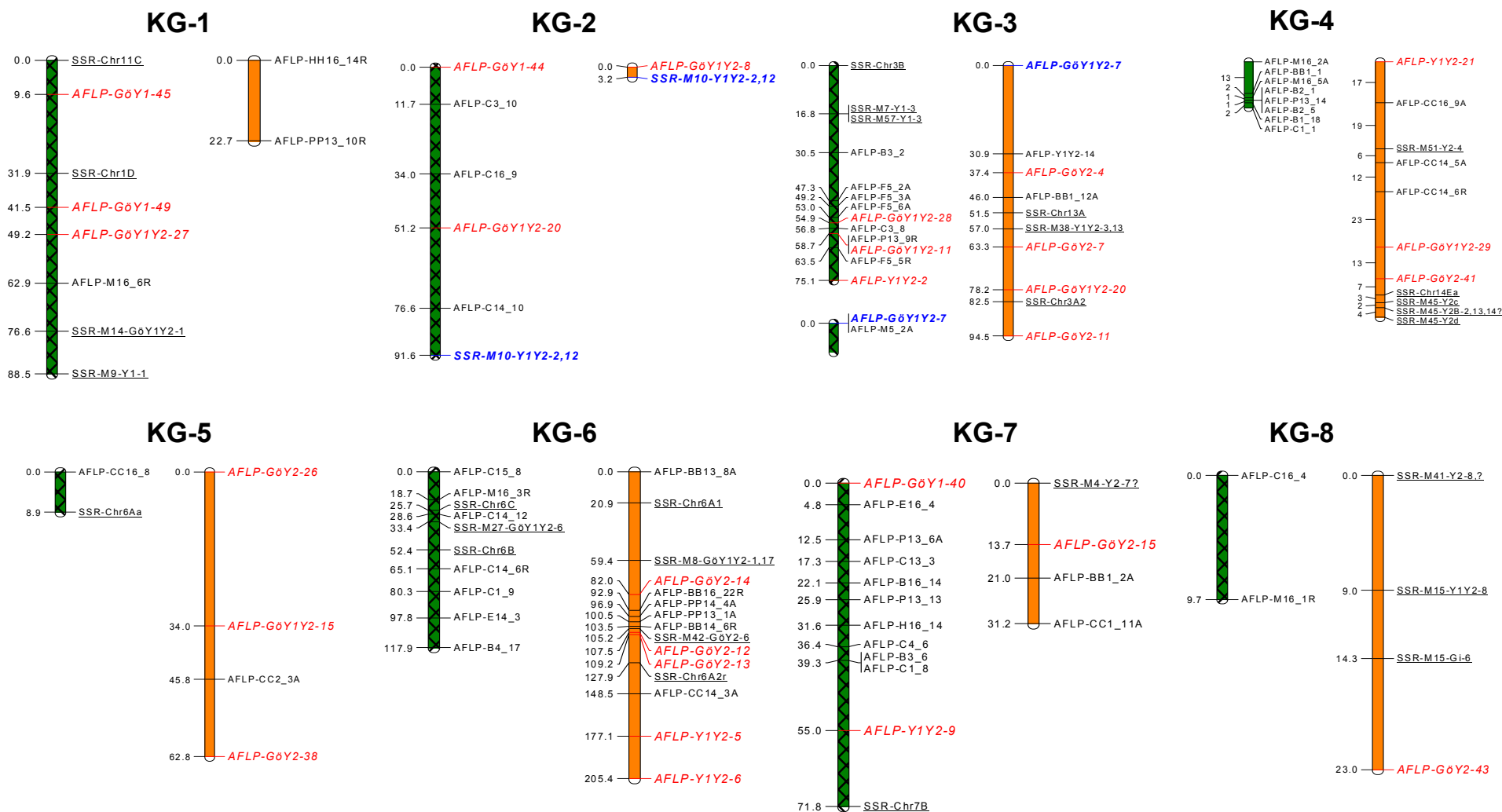
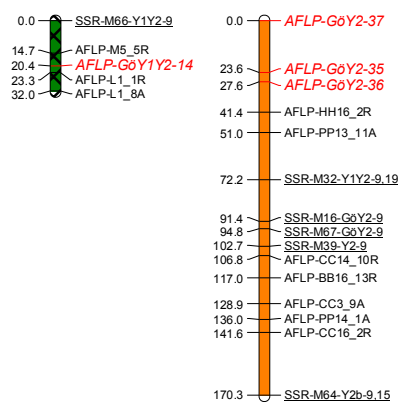
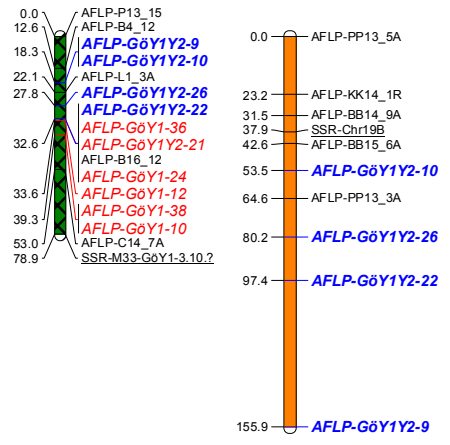


Abb. 13. Genetische Konsensuskarte der YE1-DH-Population und der YE2-F<sub>2</sub>-Population, basierend auf AFLP- und SSR-Markern. Zum Abgleich der Karten wurden Marker verwendet (rote Markierung), die gemeinsam auf Kopplungsgruppen der genetischen Karten von YE1, YE2, der Kreuzung ‚Mansholts‘ x ‚Samourai‘ (Gö) oder der öffentlich verfügbaren SSR-Karte des BBSRC lokalisiert wurden. Die Numerierung der Kopplungsgruppen folgt der internationalen *B. napus*-Standardnomenklatur nach Parkin *et al.* (1995), Sharpe *et al.* (1995) bzw. Osborn *et al.* (1997); Kodierungskürzel der Marker s. Tabellen A5 und A13; Forts. S. 48, 49.

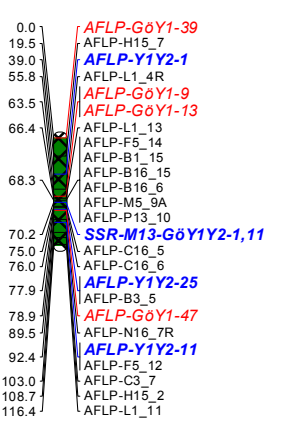
### KG-9



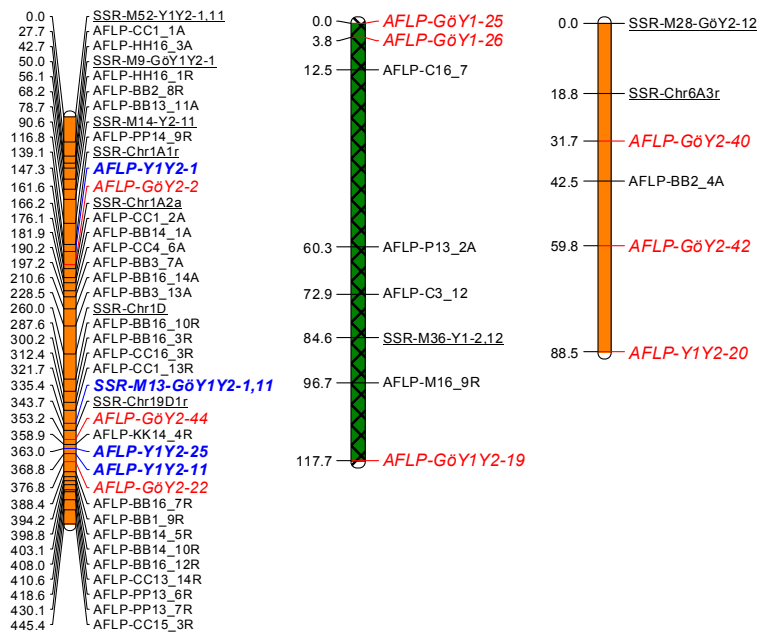
### KG-10



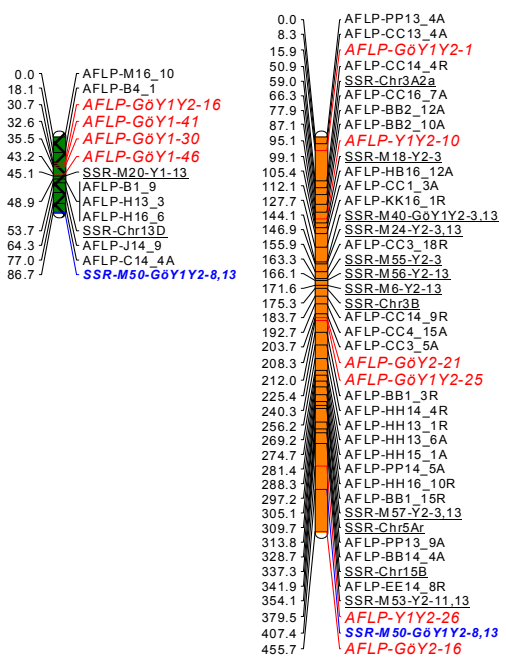
### KG-11



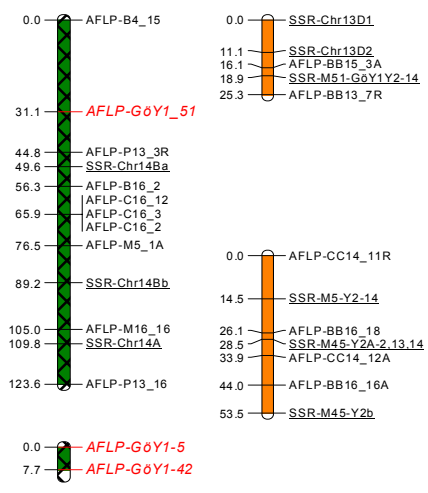
### KG-12



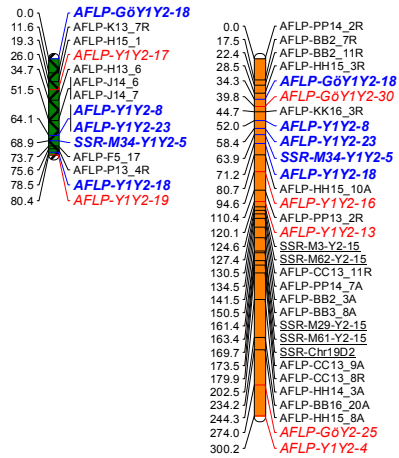
### KG-13



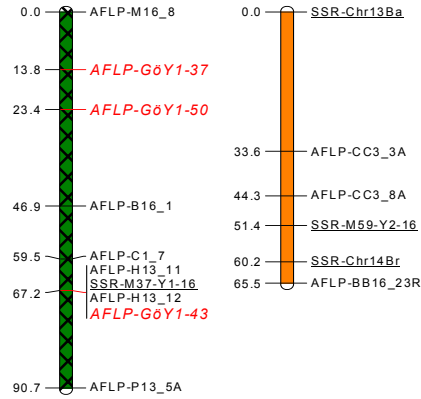
### KG-14



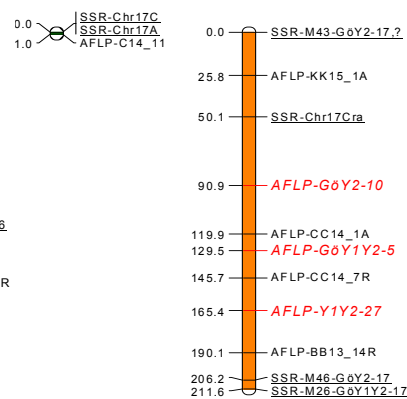
### KG-15



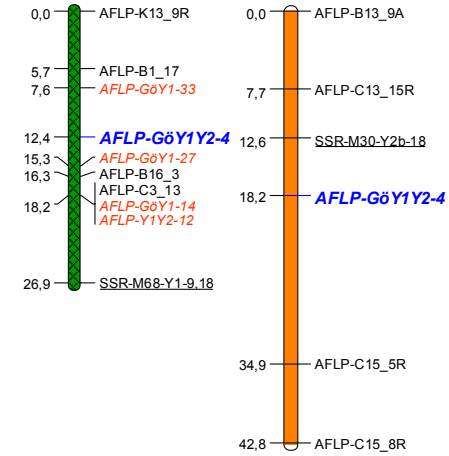
### KG-16



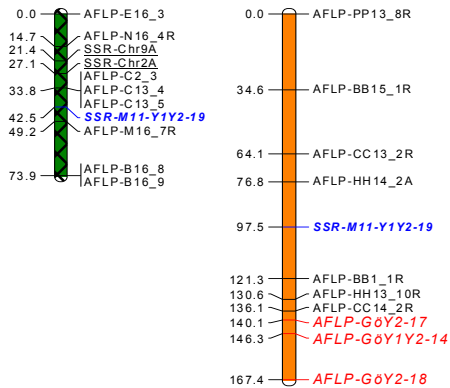
### KG-17



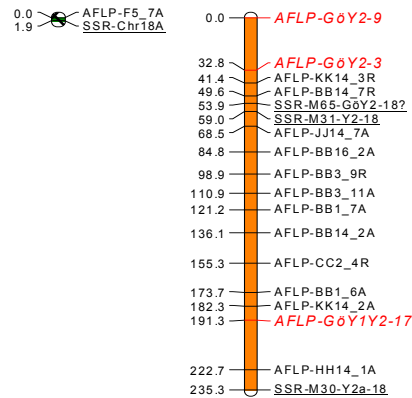
### KG-18



### KG-19



### KG-20/18



### 4.3. QTL-Kartierung

Mit Hilfe der QTL-Analyse sollten Genomabschnitte identifiziert werden, die an der Ausprägung der Samenfarbe beteiligt sind. Zu diesem Zweck wurden die beobachteten phänotypischen Werte von YE1 aus zwei Umwelten und von YE2 aus einer Umwelt zusammen mit den phänotypischen Daten aus den Marker-Analysen mit dem Programm PLABQTL, Version 1.1 (Utz und Melchinger 2000), verrechnet

Es konnten QTL für Samenfarbe, ADF-Gehalt, Ölgehalt und Proteingehalt lokalisiert werden. Die Ergebnisse der QTL-Analyse sind in Abb. 14 sowie in Tab. 10 zusammenfassend dargestellt.

#### 4.3.1. QTL für Samenfarbe in den Kreuzungen YE1 und YE2

In der YE1-DH-Population konnten zwei QTL für Samenfarbe lokalisiert werden. Ein signifikanter Major-Locus mit einem LOD-Wert von 22,3 fand sich auf der Kopplungsgruppe 18 und ein Minor-Locus (LOD 2,2) auf der Kopplungsgruppe 15 (Tab. 10). Der Additiveffekt des QTL auf Kopplungsgruppe 18 beträgt 2,1% und die durch diesen Major-Locus erklärte phänotypische Varianz 62,4%. Der zweite QTL hat mit 0,7% einen niedrigeren Additiveffekt, die erklärte partielle phänotypische Varianz beträgt 4,8%. Zusammen erklären die beiden Samenfarben-QTL 59,4% der phänotypischen Varianz. Die positiv wirkenden Allele stammten in beiden Fällen aus dem gelbsamigen Elter.

In der YE2-F<sub>2</sub>-Population erklären drei QTL auf den Kopplungsgruppen 11, 15, und 18 59,8% der beobachteten phänotypischen Varianz für die Samenfarbe (Abb. 14, Tab. 10). Die positiven Allele aller drei QTL stammen aus dem gelbsamigen Elter 1012/98. Von besonderem Interesse sind ein Major-Locus auf der Kopplungsgruppe 18 und ein Minor-Locus auf der Kopplungsgruppe 15, da in den beiden Kreuzungen YE1 und YE2 in den gleichen Regionen gemeinsame AFLP-Marker (*AFLP-GöY1Y2-4* auf Kopplungsgruppe 18 bzw. *AFLP-GöY1Y2-18* auf Kopplungsgruppe 15) vorliegen (Abb. 14). Die QTL wurden mit einem hohen LOD-Wert von 34,5 auf der Kopplungsgruppe 18 bzw. von 8,6 auf Kopplungsgruppe 15 detektiert und erklären den größten Anteil der phänotypischen Varianz von 58,8% bzw. 19,9%, bei einem Additiveffekt von 1,2% bzw. 0,5%. Der dritte QTL, ein Minor-Locus für Samenfarbe (LOD 3,5), wurde auf

Kopplungsgruppe 11 nachgewiesen. Mit 8,7% erklärt er von allen drei QTL den geringsten Anteil der beobachteten phänotypischen Varianz und zeigt zudem den geringsten Additiveffekt (0,4%).

#### **4.3.2. QTL für ADF-Gehalt in den Populationen YE1 und YE2**

Die quantitativen Daten zum ADF-Gehalt erlaubten in den beiden Kreuzungen die Identifizierung von entsprechenden QTL für ADF-Gehalt auf den gleichen Kopplungsgruppen; diese stimmen zudem mit den Regionen überein, in denen sich das jeweilige positive Allel oder der Major-Locus für Samenfarbe befinden. Der Major-Locus wurde bei LOD-Werten von 6,1 (YE1) bzw. 11,8 (YE2) auf Kopplungsgruppe 18 lokalisiert und erklärt 24,6 bzw. 27,3% der phänotypischen Varianz und 48,1 bzw. 72,0% der partiellen phänotypischen Varianz in den jeweiligen Kreuzungen. Dieser Major-Locus liegt in dem gleichen Intervall wie der Major-Locus für Samenfarbe der genetischen Karten für YE1 und YE2 (Tab. 10, Abb. 14). Zwei Minor-Loci mit einem LOD-Wert von 4,1 und 5,6 (YE1) wurden auf Kopplungsgruppe 11 lokalisiert und erklären 22,9 bzw. 17,4% der phänotypischen Varianz und 9,0 bzw. 10,3% der partiellen phänotypischen Varianz in den beiden Minor-Loci. Zusammen erklären die QTL 76,7% (YE1) bzw. 49,0% (YE2) der gesamten phänotypischen Varianz für das Merkmal ADF-Gehalt. Die positiv wirkenden Allele für ADF-Gehalt stammen in beiden Populationen aus dem gelbsamigen Elter (Tab. 10, Abb. 14).

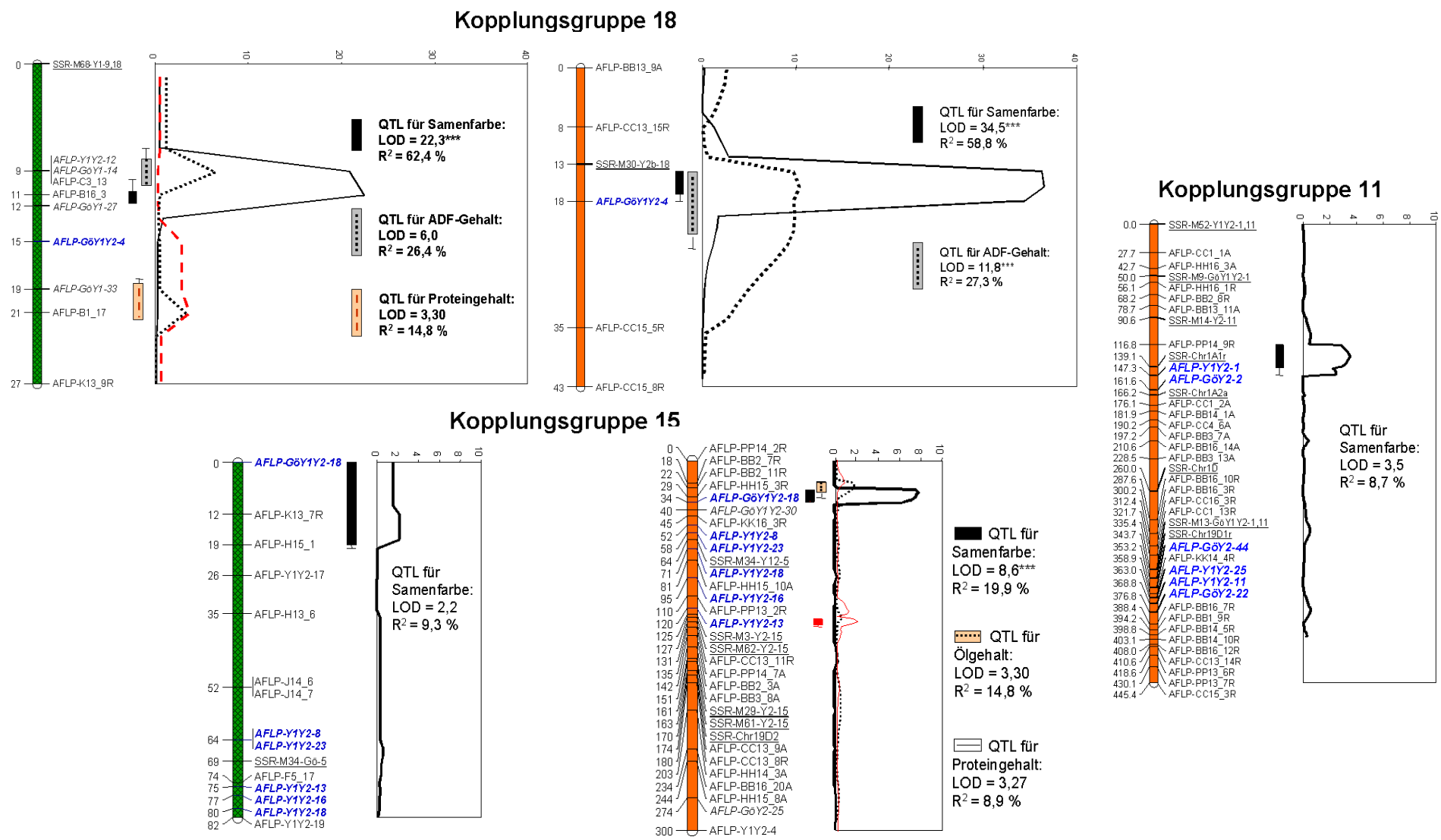


Abb. 14. Lokalisation der QTL für Samenfarbe (durchgezogene Linien) und ADF (punktierte Linien) in den Populationen YE1-DH und YE2-F<sub>2</sub>. Durch das Vorhandensein gemeinsamer Referenz-Marker (blau) war ein Abgleich möglich. Ein colocalisierender QTL für Proteingehalt wurde in YE1 auf KG18 entdeckt. In YE2 waren QTL für Proteingehalt und Ölgehalt mit dem Samenfarbe-QTL auf KG15 assoziiert; Kodierungskürzel der Marker siehe Tabellen A5 und A13.

Tab. 10. Ergebnisse der QTL-Analyse für Samenfarbe, ADF-, Öl- und Protein-Gehalt der Kreuzungen YE1 und YE2.

Merkmal	Kreuzungs- population	Marker-Intervall	KG	LOD- Wert	R <sup>2</sup> (%)	Partial R <sup>2</sup> (%)	Add. Effekt(%)	Allel aus
<b>Samenfarbe (Farbwert- MARVIN)</b>	YE1-DH	AFLP-K13_7R / AFLP-H15_1	15	2,2	9,3	4,8	-0,66	'25629-3'
	(n=105)	AFLP-GöY1-27 / AFLP-B16_3	18	22,3***	62,4	59,4	-2,09	'25629-3'
	<i>Total R<sup>2</sup> = 59,4</i>							
	YE2-F <sub>2</sub>	AFLP-PP14_9R / <u>SSR-Chr1r</u>	11	3,5	8,7	6,7	-0,36	'1012/98'
(n=179)	AFLP-HH15_3R / AFLP-BB2_11R	15	8,6**	19,9	13,9	-0,51	'1012/98'	
	AFLP-GöY1Y2-4 / AFLP-CC15_5R	18	34,5***	58,8	53,5	-1,20	'1012/98'	
<i>Total R<sup>2</sup> = 59,8</i>								
<b>ADF-Gehalt (% TM)</b>	YE1-DH	AFLP-H15_2 / AFLP-L1_11	11	5,6**	22,9	9,0	-0,67	'25629-3'
	(n=80)	AFLP-GöY1_47 / AFLP-N16_7R	11	4,1*	17,4	10,3	-0,51	'K26-96'
		AFLP-B16_3 / AFLP-Y1Y2-12	18	6,1***	24,6	72,0	-1,22	'25629-3'
	<i>Total R<sup>2</sup> = 76,7</i>							
	YE2-F <sub>2</sub>	AFLP-GöY1Y2-4 / AFLP-CC15_5R	18	11,8***	27,3	48,1	-0,90	'1012/98'
(n=170)	<i>Total R<sup>2</sup> = 49,0</i>							
<b>Ölgehalt (% TM)</b>	YE1-DH	<u>SSR-M66-Y1Y2-9</u> / AFLP-M5_5R	9	4,0	17,7	10,7	2,15	'25629-3'
	(n=80)	<u>SSR-M36-Y1-2,12</u> / AFLP-M16_9R	12	3,9	17,2	5,3	-2,52	'K26-96'
		AFLP-GöY1-46 / <u>SSR-M20-Y1-13</u>	13	2,2	10,3	4,0	-1,52	'25629-3'
	<i>Total R<sup>2</sup> = 21,4</i>							
	YE2-F <sub>2</sub>	<u>SSR-M52-Y1Y2-1,11</u> / AFLP-CC1_1A	11	3,9	10,7	7,9	-1,24	'1012/98'
(n=170)	AFLP-BB2_11R / AFLP-BB2_7R	15	2,6	7,2	7,5	-1,06	'1012/98'	
	AFLP-BB16-17R / AFLP-BB13_9A	18	2,4	6,5	6,0	-0,91	'1012/98'	
<i>Total R<sup>2</sup> = 19,7</i>								
<b>Protein- gehalt (% TM)</b>	YE1-DH	<u>SSR-Chr1D</u> / AFLP-GöY1-49	1	3,1	13,9	1,7	-0,96	'25629-3'
	(n=80)	AFLP-GöY1-45 / <u>SSR-Chr1D</u>	1	4,2	20,0	6,3	-1,15	'25629-3'
		<u>SSR-Chr9A</u> / <u>SSR-Chr2A</u>	19	2,7	12,1	8,5	-0,79	'25629-3'
		AFLP-B1-17 / AFLPGöY1-33	18	3,3	14,8	11,0	1,06	'K26-96'
<i>Total R<sup>2</sup> = 26,1</i>								
	YE2-F <sub>2</sub>	<u>SSR-M52-Y1Y2-1,11</u> / AFLP-CC1_1A	11	2,4	6,6	4,4	-1,66	
(n=170)	AFLP-CC13_11R / <u>SSR-M62-Y2-15</u>	15	3,3	8,9	5,3	0,70	'1012/98'	
<i>Total R<sup>2</sup> = 8,2</i>								

\* signifikant auf dem 0,05 Niveau durch Permutations-Analyse

\*\* signifikant auf dem 0,01 Niveau, \*\*\* signifikant auf dem 0,001 Niveau

R<sup>2</sup> (%)=phänotypische Variation, Partial R<sup>2</sup> (%)= partielle phänotypische Varianz, KG= Kopplungsgruppe



### 4.3.3. QTL für Öl- und Proteingehalt in den Populationen YE1 und YE2

Für den Ölgehalt wurden in YE1 drei QTL auf den Kopplungsgruppen 9, 12 und 13 detektiert, die zusammen 21,4% der phänotypischen Varianz erklären. Die positiven Allele der QTL auf den Kopplungsgruppen 9 und 13 stammen jeweils aus dem gelben Elter, bei LOD-Werten von 4,0 bzw. 2,2 erklären sie allerdings lediglich 17,7 bzw. 10,3% der phänotypischen Varianz für den Ölgehalt. Der Locus mit der höchsten partiellen phänotypischen Varianz von 10,7% liegt auf der Kopplungsgruppe 9 (Tab. 10).

Für Proteingehalt wurden in YE1 vier QTL ermittelt. Auf Kopplungsgruppe 1 wurden zwei benachbarte QTL (LOD=3,1 bzw. 4,2) gefunden, ein dritter Locus wurde auf Kopplungsgruppe 19 detektiert. Diese QTL erklären 13,9 bzw. 20,0 und 12,1% der phänotypischen Varianz für Proteingehalt, wobei die partielle phänotypische Varianz 1,7 bzw. 6,3 und 8,5% beträgt. Auf Kopplungsgruppe 18 befindet sich der vierte QTL für Proteingehalt (LOD=3,3,  $R^2=14,8\%$ ); dieser Locus colokalisiert mit dem zweiten QTL für ADF-Gehalt auf dieser Kopplungsgruppe.

In der Population YE2-F<sub>2</sub> wurden drei QTL für Ölgehalt auf den Kopplungsgruppen 11, 15, 18 lokalisiert. Diese QTL erklären 10,7 bzw. 7,2 und 6,5% der phänotypischen Varianz mit einer gesamten phänotypischen Varianz von 19,7%. Für den Protein-Gehalt wurden zwei QTL auf den Kopplungsgruppen 11 und 15 detektiert, welche 6,6% und 8,9% der phänotypischen Varianz bzw. 4,4 und 5,3% der partiellen phänotypischen Varianz in beiden Loci erklären. Die gesamte phänotypische Varianz entspricht demnach 8,2 %. Jeweils ein QTL für Öl- bzw. Proteingehalt liegen dabei assoziiert im jeweils gleichen Intervall auf den Kopplungsgruppen 11 bzw. 15 vor. In dem betreffenden Intervall von Kopplungsgruppe 15 wurde auch einer der Minor-QTL für Samenfarbe detektiert.

## 5. DISKUSSION

Die Grundlagen der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse bezüglich der Vererbung der Samenfarbe konnten durch erstmals durchgeführte, vertiefende Untersuchungen zum ADF-Gehalt teilweise aufgeklärt werden. Dabei stimmen die Resultate hinsichtlich der Samenfarbe sowohl mit den Ergebnissen der QTL-Analyse von Somers *et al.* (2001) als auch mit den von Liu *et al.* (2005a) beschriebenen Spaltungsmustern für Samenfarbe bei *B. napus* gut überein. Die Kombination der QTL-Informationen aus Spaltungsdaten von DH- und/oder  $F_2$ -Populationen für zwei unabhängige, von unterschiedlichen Gelbsamigkeitsquellen abgeleiteten Kreuzungen untermauern die Hypothese zum Vererbungsmodus, die in den beiden früheren Studien postuliert wurde: in beiden Fällen interagiert ein partiell dominantes Gen für gelbe Samenfarbe epistatisch mit zwei zusätzlichen Loci bei der Ausprägung der Samenfarbe bei *B. napus*. Die beiden letzteren Loci wurden von Liu *et al.* (2005b) als dominante Gene für schwarze Samenfarbe beschrieben. Das zugrunde liegende genetische Modell ist in Tab. 7 den verschiedenen Spaltungsverhältnissen (bigenisch gegenüber trigenisch) gegenübergestellt, die in den beiden Kreuzungen YE1 bzw. YE2 der vorliegenden Studie beobachtet wurden. Die von Liu *et al.* (2005a) vorgeschlagene Spaltungshypothese basierte auf Kreuzungen einer gelbsamigen DH-Linie chinesischen Ursprungs mit zwei genetisch unterschiedlichen Rapsorten mit Canola-Qualität. Die Übereinstimmung der hier erzielten Ergebnisse mit dem Liu-Modell deutet darauf hin, dass die genetische Kontrolle der Samenfarbe in beiden untersuchten Gießener Gelbsamigkeitsquellen der in dem chinesischen Material ähnlich ist.

Zwei eng mit dem Haupt-QTL für Samenfarbe gekoppelte Marker wurden in Gießen an einer weiteren unabhängigen Kreuzung zwischen anderen gelb- bzw. schwarzsamigen Eltern getestet, und die Markeranalyse bestätigte, dass anscheinend der gleiche Haupt-Locus in allen drei Gelbsamigkeitsquellen vorkommt. Dessen zentrale Rolle bei der Ausprägung der Samenfarbe in *B. napus* in allen hier beschriebenen Fällen steht Beobachtungen bei *Arabidopsis thaliana* gegenüber; hier ist eine grosse Anzahl von Genen bekannt, die *transparent testa*-Mutationen hervorrufen (Shirley *et al.* 1995, Winkel-Shirley 2001) und somit zu gelbschaligen Samen führen.

Auf der Basis der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zur Genetik der Samenfarbe und des ADF-Gehalts wird folgende Hypothese für die genetische Kontrolle der Samenfarbe bei Raps vorgeschlagen: Das Vorhandensein eines oder zwei dominanter Allele an dem Hauptgen-Locus für Samenfarbe bedingt immer einen nicht-

schwarzsamigen Phänotyp und trägt zudem zu einer Verringerung der Rohfaser bei; hieraus rührt die enge Korrelation zwischen Samenfarbe und ADF-Gehalt her. Somit stellt der Haupt-QTL für Samenfarbe bei Raps wahrscheinlich ein dominantes Gen dar, welches zu einer Verringerung des ADF-Gehaltes beiträgt. Braun- bzw. gelbschalige Samen besitzen immer eine dünnere Samenschale (Neubert *et al.* 2003), woraus zu schließen ist, dass dieses Major-Gen die Entwicklung der Testa beeinflusst. Dieser Befund ist besonders für die Ölraps-Züchtung von Interesse, da hellere Sorten als Hauptvorteil eine Reduktion der Rohfaser versprechen. Die hier vorgestellten Ergebnisse lassen erkennen, dass ein stabil vererbender, braun- oder gelbsamiger Raps mit verringertem Rohfaser-Anteil durch Selektion auf ein einzelnes, dominantes Gen gezüchtet werden könnte; Voraussetzung dabei ist, dass die mitvererbten, epistatischen Loci bzw. günstigen Allele bereits homozygot vorliegen. Diese Annahme wurde von Liu *et al.* (2005b) durch weitere Kreuzungen mit dem oben beschriebenen chinesischen Material bestätigt.

Nach dem hier dargestellten genetischen Modell resultiert die Expression eines oder mehrerer dominanter Allele an jedem der beiden möglichen epistatischen Samenfarbeloci in schwarzen Samen, solange das postulierte Hauptgen für den Fasergehalt in doppelt-rezessiven Zustand vorliegt. Im Hinblick auf die Samenfarbe induziert das ADF-Hauptgen demnach eine Reduktion der Samenschalendicke, was eine Verringerung der räumlichen Einlagerungskapazität für braune Pigmente (kondensierte Tannine) in der Samenschale zur Folge hat. Die beiden dominierenden Loci für schwarze Samenfarbe stellen daher vermutlich voreinander unabhängige Gene dar, die für die Synthese der kondensierten Tannine verantwortlich sind. Es ist anzunehmen, dass während der Pigment-Einlagerung in die Samenschale diese additiv wirkenden Gene zur Pigmentierung beitragen, wobei die Menge (und damit das Maß an Pigmentierung) durch die Dicke der Testa reguliert wird; diese wiederum wird von dem ADF-Hauptgen kontrolliert. Stellt die Samenschalendicke nicht den limitierenden Faktor dar (d.h. bei doppelt-rezessiven Allelen im ADF-Hauptgen), würde gemäß Modell nur eine deutliche Verringerung der Pigmentbiosynthese, hervorgerufen durch eine reduzierte Expression an beiden epistatischen Loci, nicht-schwarze Samen zur Folge haben. Andererseits werden gelbe und braune Farbklassen durch eine differentielle Expression dieser Gene in den Genotypen verursacht, bei denen das Hauptgen dominant vorliegt. Die Schwierigkeiten bei der Differenzierung der gelben und braunen Farbklassen könnten durch eine starke Genotyp-Umwelt Wechselwirkung auf die

Expression der Pigment-Synthese-Gene verursacht werden. Dieser Effekt ist bei schwarzsamigen Genotypen nicht so offensichtlich, vermutlich weil die Sättigung einer dickeren Testa mit kondensierten Tanninen Schwankungen in der Pigmentmenge effektiv maskiert; nur wenn beide Pigmentsynthesegene weniger stark exprimiert werden, sind in den Genotypen mit doppelt-rezessiv vorliegendem ADF-Hauptgen hellerfarbige Samen zu erwarten.

Die vielversprechendsten Kandidatengene, die dem hier vorgestellten genetischen Modell entsprechen, sind die *TT*-Loci aus *A. thaliana*, die verschiedene Schlüsselenzyme der Flavonoidbiosynthese kodieren (siehe Abb. 17; für Einzelheiten zu den Genen vgl. [www.genome.jp/kegg/pathway/ath/ath00941.html](http://www.genome.jp/kegg/pathway/ath/ath00941.html)). Besonders die Enzyme Flavanon-3-Hydroxylase, kodiert von *TT6* (F3H; GenBank-Eingangsnr. At5g07990), und Flavonoid-3'-Monooxygenase, kodiert von *TT7* (F3'H; At5g07990), interagieren bezüglich zweier paralleler Verzweigungen an einer zentralen Stelle des Flavonoid-Stoffwechselweges. Zusammen steuern sind diese beiden Enzyme die Synthese von Dihydroquercetin, einem Dihydroflavanol. Von dieser Substanzklasse nimmt man an, dass sie durch Dihydroflavonol-4-Reduktase (DFR, *TT3*) in Flavan-3,4,-Diole (Leukoanthocyanidine) umgewandelt wird. Da letztere direkte Vorläufer sowohl von Anthocyaninen als auch von Proanthocyanidinen (kondensierte Tannine) sind, sind die an ihrer Synthese beteiligten Enzyme erste Kandidaten als Regulatoren der Samenpigment-Biosynthese. Die Nicht-Expression von F3H, F3'H oder DFR würde die Produktion von kondensierten Tanninen stark reduzieren oder auch ganz unterdrücken; eine verringerte Expression eines oder mehrerer dieser Gene sollte dagegen eine quantitative Verringerung der Pigmentierung bewirken. Außerdem hängt die Aktivität der Monooxygenase F3'H von Cytochrom P450 ab (Schoenbohm *et al.* 2000) und wird so durch UV-Strahlung beeinflusst, was vermutlich zumindest einen Teil der umwelt-abhängigen Variation in der Bildung und Einlagerung der Samenschalenpigmente bei *B. napus* erklärt.

Bei *B. carinata* wurde beobachtet, dass die Expression von DFR in gelbsamigen Genotypen im Vergleich zu braunsamigen deutlich verringert war (Marles *et al.* 2003). Für andere, direkt an der Flavonoid-Biosynthese beteiligte Gene, konnten jedoch mindestens vier (*TT5*, Chalcon-Isomerase) oder sogar mehr (*TT4*, Chalcon-Synthase) homoeologe Genkopien in *B. napus* nachgewiesen werden (Lotz *et al.* 2003). In *A. thaliana* liegen diese Gene in nur einer Kopie vor, und nicht-funktionelle Mutanten zeigen den *transparent testa*-Phänotyp. Andererseits werden im komplexen,

polyploiden Genom von *B. napus* funktionelle Mutationen an Einzelloci von mehrfach vorhanden Genen wahrscheinlich durch die Expression von homeologen Loci kompensiert. Interessanterweise lokalisierten Van Deynze *et al.* (1995) jedoch einen RFLP-Marker aus einer vom Chalcon-Synthase-Gen abgeleiteten cDNA an einer Position in der Nähe eines QTL in *B. napus*, der in der von ihnen bearbeiteten DH-Kartierungspopulation 11,5% der beobachteten Variation der Samenfarbe erklärt.

Das samenspezifische Gen *TT1* (At1g34790) kodiert für eine *WIP*-Zinkfinger enthaltende Proteindomäne (Sagasser *et al.* 2002), die an der Entwicklung des Samenendotheliums beteiligt ist, in das die Tannin-Pigmente eingelagert werden. Daher stellt dieses Gen, welches als potenzieller Regulator gilt (Shirley *et al.* 1995), einen möglichen Kandidaten für das vermutliche Haupt-Gen dar, das die Einlagerung der ADF-Rohfaser kontrolliert; BAC-Klone mit vier homeologen *TT1*-Kopien konnten von Lotz *et al.* (2003) bereits in *B. napus* isoliert werden. Die vorläufigen QTL- und Spaltungsdaten für ADF lassen vermuten, dass die Vererbung des Rohfasergehaltes in den verschiedenen Raps-Kreuzungen unterschiedlich ist, wobei aber ein einzelnes, dominantes Gen eine Hauptrolle bezüglich der Verringerung des ADF-Gehaltes spielt. Dies könnte theoretisch mit multiplen homoeologen Kopien von *TT1* erklärt werden, die gemeinsam die Rohfasereinlagerung regulieren. Die genetische Kartierung der entsprechenden homoeologen *TT1*-Kopien in *B. napus* sollte es in Zukunft ermöglichen, deren Zusammenhang mit den Haupt-QTL für Samenfarbe und ADF aufzuklären. Davon unabhängig stellen die in der vorliegenden Studie identifizierten und eng mit der Samenfarbe und dem ADF-Gehalt gekoppelten Marker ein wertvolles Hilfsmittel bei der Züchtung von braun- oder gelbsamigen Ölraps mit einem verringerten Rohfaseranteil dar.

Der Annahme, dass die *transparent testa*- Gene in die Ausprägung des analogen Ölraps-Merkmals 'gelbe Samenfarbe' involviert sind, scheint entgegenzustehen, dass alle *TT*-Gene in *A. thaliana* rezessiv vererbt werden. Andererseits stimmte die Vererbung bei den hier sowie bei den von Somers *et al.* (2001) und Liu *et al.* (2005a, 2005b) untersuchten *B. napus*-Kreuzungen in allen Fällen mit der eines dominant vererbten Hauptgens für gelbe Samenfarbe überein. Hingegen deuteten frühere Studien an anderen gelbsamigen Genotypen eine dreifach-rezessive Vererbung der Gelbsamigkeit an (Shirzadegan 1986, Henderson und Pauls 1992), wobei eine QTL-Analyse dieses Materials einen deutlich geringeren Effekt dieser drei Loci auf die Samenfarbenvariation zeigten (Van Deynze *et al.* 1995). Diese sich scheinbar widersprechenden Studien hinsichtlich der gelben Samenfarbe könnten durch eine

multi-allelische Kontrolle von (mindestens) zwei unterschiedlichen *B. napus*-Allelen für den Hauptgen-Locus erklärt werden. Je nach Allelzustand an diesem Hauptgen-Locus scheint hier von einem epistatisch rezessiven Effekt auf das schwarzsamigkeitsbedingende Allel (wie in *A. thaliana*) bzw. einem epistatisch dominanten Effekt auf das schwarzsamigkeitsbedingende Allel (wie in dem hier beschriebenen Material) auszugehen sein. Andererseits ist es möglich, dass die unterschiedliche Merkmalsausprägung von unabhängigen Mutationen in verschiedenen Genen herrührt, welche jeweils den Fasergehalt und die Endotheliumdicke (Samenschale) beeinflussen.

In der vorliegenden Untersuchung war die Samenfarbe in YE1 mit dem Proteingehalt negativ korreliert ( $r=-0,38$ ), nicht aber in YE2 ( $r=-0,04$ ). Dagegen konnte in YE2 eine Korrelation zwischen Samenfarbe und Ölgehalt ( $r=0,34$ ) gefunden werden, nicht aber in YE1 ( $r=-0,004$ ). Wurde jedoch die Summe von Protein- und Ölgehalt betrachtet, so konnte eine Korrelation mit der Samenfarbe nachgewiesen werden ( $r=-0,23$  in YE1,  $r=0,43$  in YE2). Diese Beobachtung entspricht der Erwartung, da eine Verringerung der Testa-Dicke bei hellsamigen Genotypen den relativen Beitrag der Kotyledonen zum Gesamt-Trockengewicht und somit die relativen Anteile von Öl- und/oder Protein erhöht. Ein QTL für Proteingehalt konnte in YE1 an der gleichen Stelle wie der zweite QTL für ADF nachgewiesen werden. Ein Anderer stimmt mit dem Samenfarbe-QTL auf Kopplungsgruppe 15 in YE2 überein, was eine kausale Beziehung zwischen diesen Merkmalen andeutet. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass die für die Kreuzungen verwendeten und hier untersuchten Elternlinien aufgrund ihrer Spaltungen für Samenfarbe ohne Berücksichtigung ihrer Öl- oder Protein-Gehalte ausgewählt wurden.

Durch die Einführung des Allels für verringerten Rohfaseranteil in Winterraps-Elitezuchtmaterial kann insgesamt erwartet werden, dass die Öl- und/oder Proteingehalte in der Tat weiter verbessert werden können. Eine auf den Ergebnissen dieser Studie beruhende, marker-gestützte Züchtung sollte den Zucht-Fortschritt hinsichtlich reinerbiger, hellsamiger Ölrapsorten mit verbesserter Schrotqualität beschleunigen – sowohl in Hinblick auf eine Verwendung des Pressrückstandes als Futtermittel als auch als Basis für die Gewinnung von hochwertigem Protein für die Tierernährung.

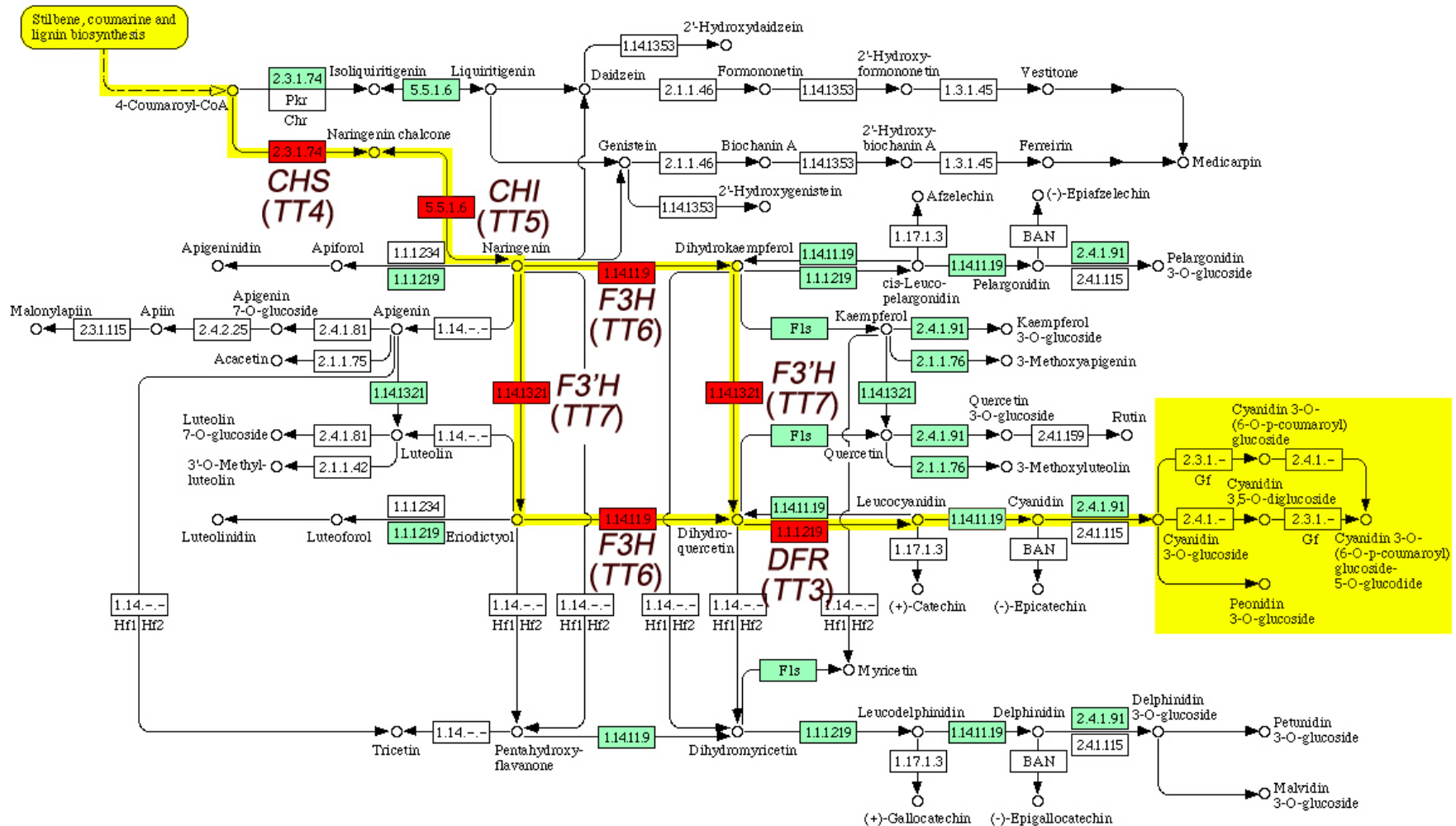


Abb. 17. Detailliertes Schema des Flavonoid-Biosyntheseweges in *Arabidopsis thaliana* (aus Kyoto Encyclopaedia of Genes and Genomes, 2004); hervorgehoben sind die *transparent testa* (TT) Schlüsselgene, die an der Akkumulation der kondensierten Tannine (gelber Block) beteiligt sind. Weitergehende Informationen über die am Biosynthesewege beteiligten Gene und Enzyme sind in der interaktiven Version des Diagrammes verfügbar ([http://www.genome.jp/dbget-bin/www\\_bget?path:ath00941](http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?path:ath00941)).

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel der vorliegenden Studie war die Aufklärung der genetischen Kontrolle der Samenfarbe in verschiedenen Winterraps-Kreuzungen durch die Lokalisierung von quantitativen Merkmalsloci (*quantitative trait loci*, QTL) für Samenfarbe und assoziierte Merkmale. Gelbe Rapssamen zeigen einen gegenüber schwarzen Samen erhöhten Öl- bzw. Proteingehalt, wegen des Vorkommens gemeinsamer Vorstufen in der Lignin- und Pigmentbiosynthese kann auch ein geringerer Rohfasergehalt angenommen werden. Dieser wird wesentlich vom ADF-Gehalt beeinflusst (*acid detergent fibre*: Lignin und Cellulose) und spielt eine wichtige Rolle für die Gesamtqualität und weitere Verwertbarkeit des Raps-Presskuchens nach der Ölextraktion.

Je eine Winterraps-DH- bzw. F<sub>2</sub>-Population wurden hierzu untersucht, welche auf Kreuzungen zwischen jeweils einer unterschiedlichen Gelbsamigkeitsquelle und verschiedenen schwarzsamigen Eltern zurückgingen (YE1 = 'T 25629 x DH 26-96', bzw. YE2 = 'Express 617 x 1012-98'). Mit der Hilfe von 197 bzw. 252 AFLP- und SSR-Markern wurden genetische Karten für YE1 bzw. YE2 entwickelt, die bei einer Gesamtgröße von 1320 bzw. 2953 cM 22 bzw. 21 Kopplungsgruppen umfassen. Nach Erstellung einer Konsensus-Karte mit Hilfe von Brückenmarkern sowie durch Abgleich mit publizierten Rapskarten konnten in beiden Populationen zwei korrespondierende QTL für Samenfarbe gefunden werden, zusammen mit einem dritten Neben-QTL in YE2. Bei dem Haupt-QTL handelt es sich in beiden Kreuzungen um einen hochsignifikanten Major-Locus auf Kopplungsgruppe 18, der 62,4% (YE1) bzw. 58,8% (YE2) der phänotypischen Varianz für Samenfarbe bewirkt. Der jeweils zweite QTL, ein Minor-Locus, liegt auf Kopplungsgruppe 15 und erklärt 9,3% (YE1) bzw. 19,9% (YE2) der phänotypischen Varianz. Aufgrund der Existenz von eng mit diesen beiden QTL gekoppelten, übereinstimmenden AFLP-Markern ist anzunehmen, dass es sich in beiden Fällen um jeweils identische Loci in den unterschiedlichen Kreuzungen handelt. Der dritte, nur in der Population YE2 detektierte QTL für Samenfarbe erklärt als Minor-Locus weitere 8,7% der phänotypischen Varianz.

Interessanterweise wurde für den ADF-Gehalt sowohl in YE1 und YE2 ein QTL zusammen mit dem Haupt-QTL für gelbe Samenfarbe auf Kopplungsgruppe 18 lokalisiert; dieser erklärt 27,3 bzw. 24,6% der phänotypischen Varianz. Ein weiterer



ADF-QTL in YE2 findet sich auf Kopplungsgruppe 11, und insgesamt zeigte der ADF-Gehalt eine hohe Korrelation mit der Samenfarbe (YE1:  $r^2=0.88$ ; YE2:  $r^2=0.74$ ).

Anhand der kombinierten QTL- und Segregationsdaten für Samenfarbe und ADF-Gehalt (zweigipfelige Verteilung von schwarz- zu nicht-schwarzsamigen bzw. hoch-ADF- zu reduziert-ADF-haltigen Genotypen) in den beiden *B. napus*-Populationen wird vorgeschlagen, daß die Samenfarbe in *B. napus* durch ein dominantes Gen kontrolliert wird, während ein (YE1) bzw. zwei (YE2) epistatische Gene Einfluss auf die Pigmentbiosynthese haben könnten. Das Vorhandensein eines oder zweier dominanter Allele an dem Hauptgen-Locus für Samenfarbe bedingt nach diesem Vererbungsmodell immer einen nicht-schwarzsamigen Phänotyp. Zudem trägt es zu einer Verringerung der Rohfaser bei, woraus die enge Korrelation zwischen Samenfarbe und ADF-Gehalt herrührt. Hinsichtlich bekannter Gene, die hieran beteiligt sein könnten, stellen homeologe Varianten der *transparent testa-(tt)*-Gene aus *Arabidopsis thaliana* aussichtsreiche Kandidaten dar.

Insgesamt sollte eine auf den Ergebnissen dieser Studie beruhende, marker-gestützte Züchtung die Erzeugung reinerbiger, hellsamiger Winterölrapsorten mit verbesserter Schrotqualität beschleunigen – sowohl in Hinblick auf eine Verwendung des Pressrückstandes als Futtermittel als auch als Basis für die Gewinnung von hochwertigem Protein für die Tierernährung.

## 7. SUMMARY

The aim of this study was to elucidate the genetic control of seed color in different winter rapeseed crosses via a localisation of quantitative trait loci (QTL) for seed color and associated traits. Yellow rapeseeds exhibit an increased oil and/or protein content in comparison to black seeds, and due to the existence of shared precursors in lignin and pigment biosynthesis, a reduced fibre content can be assumed. The latter is strongly affected by the content of acid detergent fibre (ADF), which consists of lignin and cellulose. As an essential component, it determines the overall rapessed quality and further utilization of the seed meal after oil extraction.

By crossing two independent sources for yellow seed color to different black-seeded parents (YE1 = 'T 25629 x DH 26-96', and YE2 = 'Express 617 x 1012-98'), a DH- and a F<sub>2</sub> population, respectively, were generated and analyzed. By employing 197 or 252 AFLP- and SSR markers, respectively, genetic maps were developed for YE1 and YE2, containing 22 or 21 linkage groups with an overall length of 1320 and 2953 cM, respectively. Via anchor markers present in both locations and via comparison with published *B. napus* linkage maps, a consensus map was constructed. Two corresponding QTL for seed color were detected, together with a third and minor QTL in YE2. In both crosses, the major QTL is highly significant and located on linkage group 18, explaining 62.4% (YE1) and 58,8% (YE2) of the phenotypic variance for seed color, respectively. The second QTL, a minor locus, maps to linkage group 15 and explains 9.3% (YE1) or 19.9% (YE2) of phenotypic variance, respectively. Because of the existence of identical AFLP markers closely linked to both QTL in both populations, it can be assumed that identical loci are present in the two populations. The third, minor locus for seed color from YE2 contributes additional 8,7% to the observed phenotypic variance.

Interestingly, a QTL for ADF content could be co-located both in YE1 and YE2 with the major QTL for yellow seed color on linkage group 18; it explains 27.3 or 24.6% of phenotypic variance, respectively. An additional QTL for ADF, each, was detected in

both *B. napus* populations on linkage group 11. Overall, ADF content showed a high correlation with seed color (YE1:  $r^2=0.88$ ; YE2:  $r^2=0.74$ ).

By means of combined QTL and segregation data for seed color and ADF content in both populations (two-peaked distribution of black vs. non-black-seeded and high ADF vs. reduced ADF containing genotypes, respectively), we propose that seed color is controlled by a dominant gene in *B. napus*, with one (YE1) or two (YE2) epistatic genes possibly influencing pigment biosynthesis. The presence of one or two dominant alleles at the major locus for seed color always results in a non-black-seeded phenotyp. It additionally contributes to a reduction of fibre – a causal agent for the close correlation between seed color and ADF content. With regard to known genes possibly involved here, homeologues of the transparent testa (*tt*) genes from *Arabidopsis thaliana* are primary candidates.

In conclusion, a marker-assisted breeding based on the results of this study should accelerate the generation of pure-breeding, lightly colored winter rapeseed varieties with improved meal quality - both in respect to a utilization of seed meal as animal feed or as a basis for the extraction of highly nutritious protein for animal diet.

## 8. LITERATURVERZEICHNIS

- ANJOU K., LÖNNERDAL B., UPPSTRÖM B. & AMAN P. 1977. Composition of seeds from some *Brassica* cultivars. Swedish J. Agric. Res., **7**: 169-178.
- APPELQVIST, L.-A. 1976. Lipids in the *Cruciferae*. In: Vaughan J.G., Macleod A.J., Jones BMG (eds). The Biology and Chemistry of the *Cruciferae*. Academic Press, New York, pp. 221-278.
- APPELQVIST L.-A. & OHLSON R. 1972. Rapeseed - Cultivation, Composition, Processing and Utilization. Elsevier Publ Co, Amsterdam
- ARNHOLDT B. & SCHUSTER W. 1981. Durch Umwelt und Genotyp bedingte Variabilität des Rohprotein- und Rohfettgehaltes in Rapssamen. Fette, Seifen, Anstrichm. **83**: 49-54.
- ARUS P. & ORTON T. 1983. Inheritance and linkage relationships of isozyme loci in *Brassica oleracea*. J. Hered., **74**: 405-412.
- BAETZEL R. 2003. Development of segregating populations in the breeding of yellow-seeded winter rapeseed (*Brassica napus* L.). In Proceedings of the 11th International Rapeseed Congress 6-10 July 2003. Vol. 1. Edited by H. Sørensen. Dept. of Chemistry, The Royal Veterinary and Agricultural University, Frederiksberg, Denmark, pp. 238-242.
- BAETZEL R. 2004. Stabilität und Genetik von wertbestimmenden Inhaltsstoffengebender Rapslinien (*Brassica napus*) als Basis für die Züchtung von qualitativ hochwertigen Körnerölraps-Sorten. Dissertation, Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung I, FB Agrarwissenschaft-Ökotoxikologie und Umweltmanagement, Justus-Liebig-Universität Giessen.
- BENNETT M.D. & LEITCH I.J. 1995. Nuclear-DNA amounts in angiosperms. Annuals of Botany, **76**: 113-176.
- BENNETT, M.D. & LEITCH I.J. 2001. Angiosperm DNA C-values database (re-release 3.1, Sept. 2001). <http://www.rbghkew.org.uk/cval/homepage.html>.
- BOTSTEIN D., WHITE R., SKOLNICK M. & DAVIS R.W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. American Journal of Human Genetics, **35**: 795-815.

- BOUKEMA & VAN HINTUM. ECP/GR Brassica Database: <http://www.cgn.wageningen-ur.nl/pgc/collections/brasedb/default.htm>
- CANVIN D.T. 1965. The effect of temperature on the oil content and fatty acid composition of the oils from several oil seed crops. *Canad. J. Bot.*, **43**: 63-69
- CHEN B.Y., HANEEN W.K. & JONSSON R. 1988. Resynthesis of *Brassica napus* L. through interspecific hybridization between *B. alboglabra* Bailey and *B. campestris* L. with special emphasis on seed color. *Plant Breeding*, **101**: 52-59
- CHURCHILL G.A. & DOERGE R.W. 1994. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics*, **138**: 963–971.
- DOERGE R.W. AND. CHURCHILL G.A. 1996. Permutation tests for multiple loci affecting a quantitative character. *Genetics*, **142**: 285-294.
- DOWNEY R.K. 1990. *Brassica* oilseed breeding: achievements and opportunities. *Plant Breeding Abstracts*, **60**: 1165-1170
- DOWNEY R.K. & RÖBBELEN G. 1989. *Brassica* species. In: Röbbelen G, Downey R, Ashri A (eds) *Oil crops of the world*. McGraw-Hill Inc, New York, pp. 339-382
- DOYLE J.J. & DOYLE J.L.. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, **12**: 13-15.
- ECKE W., UZUNOVA M. & WEISSLEDER K. 1995. Mapping the genome of rapeseed (*Brassica napus* L.) 2: Localization of genes controlling erucic acid synthesis and seed oil content. *Theor. Appl. Genet.*, **91**: 972-977.
- FALCONER D.S. 1984: Einführung in die Quantitative Genetik. Ulmer Verlag, Stuttgart.
- FEINBAUM R.L. & AUSUBEL F.M. 1988. Transcriptional regulation of the *Arabidopsis thaliana* chalcone synthase gene. *Mol. Cell., Biol.*, **8**: 1985-1992.
- FONT R., DEL RIO M., FERNANDEZ J.M. & DE HARO A. 2003. Acid detergent fibre analysis in oilseed *Brassic*as by near-infrared spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.*, **51**: 2917-2922.
- FONT R., WITTKOP B., BADANI A.G., DEL RÍO-CELESTINO M., LÜHS W., FRIEDT W. & DE HARO-BAILÓN A. 2005. Toward a global calibration for acid detergent fiber in rapeseed by visible and near-infrared spectroscopy. *Plant Breeding*, (im Druck).

- FUKUOKA S., INOUE T., MIYAO A., MONNA L., ZHONG H.S., SASAKI T., MINOBE Y. 1994. Mapping of sequence-tagged sites in rice by single strand conformation polymorphism. *DNA Res.*, **1**: 271-277.
- GETINET A., RAKOW G. & DOWNEY R.K. 1996. Agronomic performance and seed quality of Ethiopian mustard in Saskatchewan. *Can. J. Plant. Sci.*, **76**: 387-392.
- GLAND A. 1982. Gehalt und Muster der Glucosinolate in den Samen von resynthesierten Rapsformen. *Z. Pflanzenzüchtung*, **88**: 242-254.
- GOERING H.K. & VAN SOEST P.J. 1970. Forage fiber analysis; apparatus, reagents, procedures, and some applications. USDA-ARS Agric. Handbook No. 379, US Govt. Print Office, Washington DC.
- GRAMI B., BAKER R.J. & STEFANSSON B.R. 1977. Genetics of protein and oil content in summer rape: heritability, number of effective factors, and correlations. *Can. J. Plant. Sci.*, **57**: 937-943
- HALDANE J.B.S. 1919. The combination of linkage values, and the calculation of distances between loci of linked factors. *Genetics*, **8**: 299-309
- HALEY C. & KNOTT S. 1992. A simple regression method for mapping quantitative trait loci of linked factors. *Genetics*, **8**: 299-309.
- HENDERSON C.A.P. & PAULS, K.P. 1992. The use of haploidy to develop plants that express several recessive traits using light-seeded canola (*Brassica napus*) as an example. *Theor. Appl. Genet.*, **83**: 476-479.
- HENEEN, W.K. & BRISMAR, K. 2001. Maternal and embrional control of seed colour by different *Brassica alboglabra* chromosomes. *Plant Breeding*, **120**: 325-329.
- HERNE C.M., GHOSH S. & TODD J.A. 1992. Microsatellite for linkage analysis of genetic traits. *Trends Genet.*, **8**: 288-294.
- JANSEN R.C. & STAM P. 1994. High resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping. *Genetics*, **136**: 1447-1455.
- JANSEN R.C., GEERLINGS H., VAN OEVEREN A.J. & VAN SCHAIK R.C. 2001. A comment on codominant scoring of AFLP markers. *Genetics*, **158**: 925-926
- KOORNNEEF M. 1994. Arabidopsis genetics. In: *Arabidopsis. Edited by E. M. Meyerowitz & C. R. Somerville*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, pp. 89-120

- KOSAMBI D.D. 1944. The estimation of map distances from recombination values. *Ann. Eugen.*, **12**: 172-175
- LANDER E.S. & BOTSTEIN D. 1989. Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics*, **121**: 185-199.
- LANDER E. S., GREEN P. ABRAHAMSON J., BARLOW A., DALY M. J., LINCOLN S. E. & NEWBURG L. 1987. MAPMAKER: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics*, **1**: 174-181.
- LANDRY B.S., HUBERT N. & ETOH T. 1991. A genetic map for *Brassica napus* based on restriction fragment length polymorphisms detected with expressed DNA sequences. *Genome*, **34**: 543-552.
- LIONNETON E., AUBERT G., OCHATT S. & MERAH O. 2004. Genetic analysis of agronomic and quality traits in mustard (*Brassica juncea*). *Theor. Appl. Genet.*, **109**: 792–799
- LIU H.L. 1983. Studies on the breeding of yellow seeded *Brassica napus* L. Proceedings of the 6th International Rapeseed Congress, Paris, France, Vol., 1: 637-641.
- LIU X.P., TU J.X., CHEN B.Y. & FU T.D. 2005a. Identification and inheritance of a partially dominant gene for yellow seed colour in *Brassica napus*. *Plant Breeding*, **124**: 9-12.
- LIU Z.W., FU T.D., TU J.X. & CHEN B.Y. 2005b. Inheritance of seed colour and identification of RAPD and AFLP markers linked to the seed colour gene in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Theor. Appl. Genet.*, **110**: 303-310.
- LOTZ T., SNOWDON R., HORN R., DEWAL G., WEISSHAAR B., FRIEDT W., CABOCHE M. & CHALHOUB B. 2003. Molecular analysis of *Arabidopsis thaliana* *tt*-genes in *Brassica napus*. In Proceedings of the 11th International Rapeseed Congress 6-10 July 2003. Vol. 1. Edited by H. Sørensen. Dept. of Chemistry, The Royal Veterinary and Agricultural University, Frederiksberg, Denmark, pp. 109-111.
- LAKSHMI PADMAJA K., ARUMUGAM N., GUPTA V., MUKHOPADHYAY A., SODHI Y. S., PENTAL D. & PRADHAN A.K. 2005. Mapping and tagging of seed coat colour and the identification of microsatellite markers for marker-assisted manipulation of the trait in *Brassica juncea* *Theor Appl. Genet.*,(im Druck).

- MARLES S., GRUBER M.Y., SCOLES G.J., & MUIR A.D. 2003. Pigmentation in the developing seed coat and seedling leaves of *Brassica carinata* is controlled at the dihydroflavonol reductase locus. *Phytochemistry*, **62**: 663-672.
- MARQUARD R. & SCHUSTER W. 1981. Veränderungen von Sameninhaltsstoffen verschiedener Rapssorten unter kontrollierten Bedingungen. *Fette, Seifen, Anstrichm*, **83**: 99-106.
- MENG J.L., SHI S.W., GAN L., LI Z.Y. & QU X.S. 1998. The production of yellow-seeded *Brassica napus* (AACC) through crossing interspecific hybrids of *B. campestris* (AA) and *B. carinata* (BBCC) with *B. napus*. *Euphytica*, **103**: 329-33.
- MICHELMORE R.W., PARAN I. & KESSELI R.V. 1991. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **88**: 9828–9832.
- MORINAGA T. 1934. Interspecific hybridization in *Brassica*. The cytology of F1 hybrids of *B. juncea* and *B. nigra*. *Cytologia*, **6**: 62–67.
- MORTON N. 1955. Sequential tests for the detection of linkage. *Am. J. Hum. Genet.*, **7**: 277-318.
- NEGI M.S., DEVIC M., DELSENY M. & LAKSHMIKUMARAN M. 2000. Identification of AFLP fragments linked to seed coat colour in *Brassica juncea* and conversion to a SCAR marker for rapid selection. *Theor. Appl. Genet.*, **101**: 146-152.
- NEUBERT A.B., LÜHS W., BAETZEL R. & FRIEDT W. 2003. Influence of seed colour on seed vigour in *Brassica napus*. In *Proceedings of the 11th International Rapeseed Congress 6-10 July 2003. Vol. 1. Edited by H. Sørensen. Dept. of Chemistry, The Royal Veterinary and Agricultural University, Frederiksberg, Denmark*, pp. 253-256.
- NØRBÆK R., J. K. NIELSEN T. & KONDO, 1999. Flavonoids from flowers of two *Crocus chrysanthus-biflorus* cultivars: 'Eye-Catcher' 'Spring Pearl' (Iridaceae). *Phytochemistry*, **51**: 1139-1146.
- OETTING W.S., LEE H.K., FLANDERS D.J., WIESNER G.L., SELLERS T.A. & KING R.A., 1995. Linkage analysis with multiplexed short tandem repeat polymorphisms using infrared fluorescence and M13 tailed primers. *Genomics*, **30**: 450–458.



- OSBORN T.C., KOLE C., PARKIN I.A.P., SHARPE A.G. & KUIPER M., 1997. Comparison of flowering time genes in *Brassica rapa*, *B. napus* and *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, **146**: 1123-1129.
- PARKIN I.A.P., SHARPE A.G., KEITH D.J. & LYDIATE D.J., 1995. Identification of the A and C genomes of amphidiploid *Brassica napus* (oilseed rape). *Genome*, **38**: 1122-1131.
- PIOTROWSKA A., KRYMANSKI J., BARTKOWIAK-BRODA I. & KROTKA K. 2003. Characteristic of yellow-seeded lines of winter oilseed rape. *In* Proceedings of the 11th International Rapeseed Congress 6-10 July 2003. Vol. 1. *Edited by* H. Sørensen. Dept. of Chemistry, The Royal Veterinary and Agricultural University, Frederiksberg, Denmark, pp. 247-249.
- QI C.K., FU S.Z. & PU H.M. 1995. A successful transfer of yellowseeded trait from *Brassica carinata* to *B. napus*. Proceedings of 9th International Rapeseed Congress, Cambridge, UK, pp. 1137– 1140.
- RAHMAN M. H. 2001. Production of yellow-seeded *Brassica napus* through interspecific crosses. *Plant Breeding*, **120**: 463-472.
- RAHMAN M. H. 2003. Yellow-seeded *Brassica napus* from interspecific crosses. *In* Proceedings of the 11th International Rapeseed Congress 6-10 July 2003. Vol. 1. *Edited by* H. Sørensen. Dept. of Chemistry, The Royal Veterinary and Agricultural University, Frederiksberg, Denmark, pp. 247-249.
- RAKOW G., RANEY J. P. & RELF-ECKSTEIN J. 1999. Agronomic performance and seed quality of a new source of yellow seeded *Brassica napus*. Proc. 10th Int. Rapeseed Congr., Canberra. GCIRC, Paris.
- RASHID A., RAKOW G. & DOWNEY R.K. 1994. Development of yellow seeded *Brassica napus* through interspecific crosses. *Plant Breeding*, **112**: 127-134.
- SAGASSER M., LU, G.H., HALBROCK K. & WEISSHAAR, B. 2002. *A. thaliana* Transparent Testa 1 involved in seed coat development and defines the WIP subfamily of plant zinc finger proteins. *Genes Dev.*, **16**: 138-49.
- RUDOLPH B. 2001. Entwicklung, Charakterisierung und genetische Kartierung von Mikrosatelliten-Markern beim Raps (*Brassica napus* L.). Dissertation, Georg August Universität, Göttingen.

- SALUNKHE D.K., CHAVAN J.K., ADSULE R.N. & KADAM S.S. 1992. World Oilseeds. Chemistry, Technology and Utilization, Van Nostrand Reinhold, New York.
- SAMPSON D.R. 1966. Genetic analysis of *Brassica oleracea* using genes from sprouting broccoli. Can. J. Genet. Cytol., **8**: 404–413.
- SCHOENBOHM C., MARTENS, S. EDER C., FORKMANN G. & WEISSHAAR B. 2000. Identification of the *Arabidopsis thaliana* flavonoid 3'-hydroxylase gene and functional expression of the encoded P450 enzyme. Biol. Chem., **381**: 749-753.
- SCHUELKE M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. Nature Biotechnology, **18**: 233-234
- SCHWETKA A. 1981. Samenfarbe bei Kohl und Rübsen und deren Einfluss auf die Samenfarbe synthetischer Rapsformen. Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen, Germany, 86 S.
- SEYIS F., SNOWDON R. J., LÜHS W. & FRIEDT W. 2003. Molecular characterisation of novel resynthesised rapeseed (*B. napus* L.) lines and analysis of their genetic diversity in comparison to spring rapeseed cultivars. Plant Breeding, **122**: 473-478.
- SHAHIDI F. 1990. Canola and Rapeseed - Production, Chemistry, Nutrition and Processing Technology, Van Nostrand Reinhold, New York.
- SAHRPE A.G., PARKIN I.A.P., KEITH D. J. & LYDIATE D. J. 1995. Frequent nonreciprocal translocations in the amphidiploid genome of oilseed rape (*Brassica napus*). Genome, **38**: 1112-1121.
- SHIRLEY B.W., HANLEY S. & GOODMAN H.M. 1992. Effect of ionizing radiation on a plant genome: analysis of two *Arabidopsis transparent testa* mutations. Plant Cell, **4**: 333-347.
- SHIRLEY B.W., KUBASEK W.L., STORZ G., BRUGGEMANN E., KOORNNEEF M., AUSUBEL F.M. & GOODMAN H.M. 1995. Analysis of *Arabidopsis* mutants deficient in flavonoid biosynthesis. Plant J. **8**: 659-671.
- SHIRZADEGAN M. & RÖBBELEN G. 1985. Influence of seed colour and hull proportions on quality properties of seeds in *Brassica napus* L. Fette, Seifen, Anstrichmittel, **87**: 235-237.
- SHIRZADEGAN M., 1986. Inheritance of seed colour in *Brassica napus* L. Z. Pflanzenzüchtung, **96**: 140-146

- SLOMINSKI B.A., CAMPBELL L.D. & GUENTER W. 1994. Carbohydrates and dietary fibre components of yellow and brown-seeded canola. *J. Agric. Food Chem.*, **42**: 704–707.
- SLOMINSKI B.A., SIMBAYA J., CAMPBELL L.D., RAKOW G. & GUENTER W. 1999. Nutritive value for broilers of meals derived from newly developed varieties of yellow-seeded canola. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **78**: 249–262.
- SNOWDON R.J., LÜHS W. & FRIEDT W., 2005. Oilseed rape, in *Genome Mapping and Molecular Breeding*, Kole, C., Ed., Oxford & IBH Publ. House, USA, Vol. 2.
- SNOWDON R. J. & FRIEDT W. 2004. Molecular markers in *Brassica* oilseed breeding: current status and future possibilities. *Plant Breeding*, **123**: 1-8.
- SOMERS D.J., RAKOW G., PRABHU V.K. & FRIESEN K.R.D. 2001. Identification of a major gene and RAPD markers for yellow seed coat colour in *Brassica napus*. *Genome*, **44**: 1077-1082.
- STEFANSSON B.R. 1983. In: Kramer J. K. G., Sauer F. D., Pigden W. J. (eds.) High and Low Erucic Acid Rapeseed Oils. Academic Press, New York, 143-160
- STRINGAM G.R., MCGREGOR D.I. & PAWLOWSKI H.S. 1974. Chemical and morphological characteristics associated with seed coat colour in rapeseed. Proceedings of the 4th International Rapeseed Congress, Giessen, Germany, pp. 99-108.
- TANG Z. L., LI J. N., ZHANG X. K., CHEN L. & WANG R., 1997: Genetic variation of yellow-seeded rapeseed lines (*Brassica napus* L.) from different genetic sources. *Plant Breeding*, **116**: 471-474
- THEANDER O., AMAN P., MIKSCH G.E. & YASUDA S. 1977. Carbohydrates, polyphenols, and lignin in seed hulls of different colors from turnip rapeseed. *J. Agric. Food Chem.*, **25**: 270-273.
- THIES W. 1991. Determination of the phytic acid and sinapic acid esters in seeds of rapeseed and selection of genotypes with reduced concentrations of these compounds. *Fat. Sci. Technol.*, **93**: 49-52
- U, N. 1935. Genome analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *Brassica napus* and peculiar mode of fertilization. *Japan. J. Bot.* **7**: 389–452.

- UTZ H.F. & MELCHINGER A.E. 1994. Comparison of different approaches to interval mapping of quantitative trait loci. In Biometrics in Plant Breeding: Applications of Molecular Markers. Proceedings of the 9th Meeting of the EUCARPIA Section, biometrics in Plant Breeding, JW van Ooijen, J Jansen (eds.), CPRO-DLO, Wageningen, Netherlands, pp. 195-204.
- UTZ H.F. & MELCHINGER A.E. 2000. PLABQTL: A computer program to map QTL. Version 1.1. Institute of Plant Breeding, Seed Science, and Population Genetics, University of Hohenheim, Germany.
- UZUNOVA M. 1994: Erstellung einer RFLP-Karte von Raps (*Brassica napus* L.) und Kartierung erster züchterisch wichtiger Gene. Dissertation, Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, FB Agrarwissenschaft, Universität Göttingen.
- UZUNOVA M., ECKE W., WEISSLEDER K. & RÖBBELEN G. 1995. Mapping the genome of rapeseed (*Brassica napus* L.). I. Construction of an RFLP linkage map and localization of QTLs for seed glucosinolate content. *Theor. Appl. Genet.*, **90**: 194-204.
- VAN DEYNZE A. & PAULS K.P. 1994: The inheritance of seed colour and vernalization requirement in *Brassica napus* using doubled haploid populations. *Euphytica*, **74**: 77-83
- VAN DEYNZE A.E., BEVERSDORF W.D. & PAULS K.P. 1993. Temperature effects on seed color in black- and yellow-seeded rapeseed. *Can. J. Plant. Sci.*, **73**: 383-387.
- VAN DEYNZE A.E., LANDRY B.S. & PAULS K.P. 1995. The identification of restriction fragment length polymorphisms linked to seed colour genes in *Brassica napus*. *Genome*, **38**: 534-542.
- VOS P., HOGERS R., BLEEKER M., REIJANS M., VAN DER LEE T., HORNES M., FRIJTERS A., POT J., PELEMAN J., KUIPER M. & ZABEAU M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.*, **23**: 4407-4414.
- WHETTEN R.W., MACKAY J.J. & SEDEROFF R. 1998. Recent advances in understanding lignin biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**: 585-609.
- WILLIAMS J.G.K., KUBELIK A.R., LIVAK K.J., RAFALSKI J.A. & TINGEY S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, **18**: 6531-6535.

- WINKEL-SHIRLEY, B. 2001. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology and biotechnology. *Plant Physiol.*, **126**: 485-493.
- WISMAN E., HARTMANN U., SAGASSER M., BAUMANN E., PALME K., HAHLBROCK K., SAEDLER H. & WEISSHAAR B. 1998. Knock-out mutants from *En-1* mutagenized *Arabidopsis thaliana* population generate phenylpropanoid biosynthesis phenotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**: 12432-12437.
- WOODS D.L. 1980. Association of yellow seed coat colour with other characteristics in mustard (*Brassica juncea*). *Eucarpia Cruciferae Newsletter*, **5**: 23-34.
- XIAO D.R. & LIU H.L. 1982. Correlation analysis of seed colour and seed oil in *Brassica napus* L. *Acta Agronomical Sinica*, **8**: 24-27.
- ZAMAN M.W., 1988: Limitations for introgression of yellow seed coat colour in *Brassica napus*. *J. Swed. Seed Assoc.*, **98**: 157-161
- ZENG Z.B. 1994. Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics*, **136**:1457-1468.
- ZIETKIEWICZ E., RAFALSKI A. & LABUDA D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, **20**: 176-183.
- <http://ukcrop.net/perl/ace/search/BrassicaDB>
- <http://www.cgn.wageningen-ur.nl/pgr/collections/brasedb/default.htm>
- <http://www.genome.jp/kegg/pathway/ath/ath00941.html>

## 9. ANHANG

Tab. A1. Zusammensetzung der für die Extraktion nach Doyle & Doyle benötigten Puffer.

<b>Extraktionspuffer</b>	
NaCl	1,4 M
Tris-HCl pH 8,0	0,1 M
EDTA pH 8,0	20 mM
CTAB	2,0% (w/v)
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	1,0% (w/v)
β-Mercaptoethanol	0,2% (v/v)
<b>TE-Puffer 10/1</b>	
Tris-HCl pH 8,0	10 mM
EDTA pH 8,0	1 mM

Tab. A2. Zusammensetzung der TNE-/Fluoreszenz-Farbstoff-Lösungen zur Bestimmung der DNA-Konzentration.

<b>10x TNE</b>	
Tris	100 mM
EDTA	10 mM
NaCl	1 M
pH 7,4	
<b>Farbstoff-Stammlösung</b>	
Hoechst 33258	10 mg
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	10 ml

Tab. A3. Zusammensetzung der Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese.

<b>Laufpuffer 10 x TBE</b>		<b>Laufpuffer 0,5 x TBE</b>	
Tris-HCl	0,89 M	10 x TBE	50 ml
Borsäure	0,89 M	H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	950 ml
EDTA pH 8,0	0,50 M		
<b>Agarose-Gel (1% bzw. 2%)</b>			
NEEO Agarose, Roth		2,5 g bzw. 5 g	
0,5 x TBE-Laufpuffer		250 ml	
<b>Bromphenolblau-Ladepuffer</b>			
Bromphenolblau		0,15 %	
Ficoll		15,0 %	
EDTA pH 8,0		10 mM	

Tab. A4. Zusammensetzung der Lösungen für Polyacrylamid-Gelelektrophorese.

<b>TE-Puffer 10/0,1</b>			
Tris – HCl pH 8,0		10,0 mM	
EDTA pH 8,0		0,1 mM	
<b>10 x TBE (Long Ranger Buffer)</b>		<b>1 x TBE (Long Ranger Buffer)</b>	
Borsäure	27,5 g	10 x TBE <sub>(Long Ranger Buffer)</sub>	100 ml
EDTA	9,3 g	H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	900 ml
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	ad 1 l		
<b>Polyacrylamid-(PAA)-Lösung (7%)</b>			
Long Ranger (50%)		35 ml	
Harnstoff		105 g	
10 x TBE <sub>(Long Ranger Buffer)</sub>		25 ml	
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>		ad 250 ml	
<b>PAA-Gel</b>			
PAA-Lösung (7%)		25 ml	
Ammoniumpersulfat (10%)		175 µl	
TEMED		17,5 µl	
<b>Formamid-Stop/Lade-Puffer (fuchsinhaltig)</b>			
Formamid		98 %	
EDTA pH 8,0		10 mM	
Fuchsin		0,025 % (w/v)	

Tab. A5. Sequenzen der verwendeten AFLP-*EcoRI* und *Mse I*-Adapter/Primer mit <sup>1)</sup>Kodierungskürzel der Abb. 10-14 und <sup>2)</sup>der Bezeichnung nach KeyGene.

Primer-Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	Primer-Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')
<u><i>EcoRI</i>-Adapter</u>		<u><i>Mse I</i>-Adapter</u>	
-	CTC GTA GAC TGC GTA CC	-	GAC GAT GAG TCC TGA G
+	AAT TGG TAC GCA GTC	+	TAC TCA GGA CTC AT
<u>E+1-Primer</u>		<u>M+1-Primer</u>	
<b>E01</b>	GAC TGC GTA CCA ATT CA	<b>M02</b>	GAT GAG TCC TGA GTA AC
<u>E+3-Primer</u>		<u>M+3-Primer</u>	
<b>A/AA</b> <sup>1)</sup> E31 <sup>2)</sup>	GAC TGC GTA CCA ATT CAA A	<b>1</b> <sup>1)</sup> M47 <sup>2)</sup>	GAT GAG TCC TGA GTA ACA A
<b>B/BB</b> E32	GAC TGC GTA CCA ATT CAA C	<b>2</b> M48	GAT GAG TCC TGA GTA ACA C
<b>C/CC</b> E33	GAC TGC GTA CCA ATT CAA G	<b>3</b> M49	GAT GAG TCC TGA GTA ACA G
<b>D/DD</b> E34	GAC TGC GTA CCA ATT CAA T	<b>4</b> M50	GAT GAG TCC TGA GTA ACA T
<b>E/EE</b> E35	GAC TGC GTA CCA ATT CAC A	<b>5</b> M51	GAT GAG TCC TGA GTA ACC A
<b>F/FF</b> E36	GAC TGC GTA CCA ATT CAC C	<b>6</b> M52	GAT GAG TCC TGA GTA ACC C
<b>G/GG</b> E37	GAC TGC GTA CCA ATT CAC G	<b>7</b> M53	GAT GAG TCC TGA GTA ACC G
<b>H/HH</b> E38	GAC TGC GTA CCA ATT CAC T	<b>8</b> M54	GAT GAG TCC TGA GTA ACC T
<b>I/II</b> E39	GAC TGC GTA CCA ATT CAG A	<b>9</b> M55	GAT GAG TCC TGA GTA ACG A
<b>J/JJ</b> E40	GAC TGC GTA CCA ATT CAG C	<b>10</b> M56	GAT GAG TCC TGA GTA ACG C
<b>K/KK</b> E41	GAC TGC GTA CCA ATT CAG G	<b>11</b> M57	GAT GAG TCC TGA GTA ACG G
<b>L/LL</b> E42	GAC TGC GTA CCA ATT CAG T	<b>12</b> M58	GAT GAG TCC TGA GTA ACG T
<b>M/MM</b> E43	GAC TGC GTA CCA ATT CAT A	<b>13</b> M59	GAT GAG TCC TGA GTA ACT A
<b>N/NN</b> E44	GAC TGC GTA CCA ATT CAT C	<b>14</b> M60	GAT GAG TCC TGA GTA ACT C
<b>O/OO</b> E45	GAC TGC GTA CCA ATT CAT G	<b>15</b> M61	GAT GAG TCC TGA GTA ACT G
<b>P/PP</b> E46	GAC TGC GTA CCA ATT CAT T	<b>16</b> M62	GAT GAG TCC TGA GTA ACT T

Kodierungsbeispiele für Primerkombinationen in den genetischen Karten (Abb. 10-14):

Population YE1: AFLP-**A1**-... = AFLP-E32M47-..., AFLP-**B13**-... = AFLP-E33M59-...

Population YE2: AFLP-**AA7**-... = AFLP-E32M53-..., AFLP-**GG16**-... = AFLP-E38M62-...

Tab. A6. AFLP-Restriktions-/Ligationsansätze.

<b>RESTRIKTION</b> ( <i>RE-Puffer/Enzym-Mix /Restriktions-MIX</i> )	<b>Arbeits-/ Stammlösung</b>	<b>pro 50 µl- Ansatz</b>
RE-Puffer/Enzym-MIX :		
5 x Reaktionspuffer	aus AFLP® Core Reagent Kit	5,4 µl
<i>EcoRI/MseI</i>	aus AFLP® Core Reagent Kit	2,0 µl
AFLP grade Water	aus AFLP® Core Reagent Kit	8,8 µl
		<b>16,2 µl</b>
Restriktions – MIX :		
RE-Puffer/Enzym-MIX	siehe oben	15,0 µl
Template - DNA	[20 ng/µ ]	10,0 µl
		<b>25,0 µl</b>
PCR-Programm: 'Restriktion' (180 min. bei 37°C)		
<b>LIGATION</b> ( <i>Adapter/Ligations - MIX</i> )	<b>Arbeits-/ Stammlösung</b>	<b>pro 50 µl- Ansatz</b>
Adapter Ligation Solution		
T4 DNA Ligase	aus AFLP® Core Reagent Kit	25,0 µl
	aus AFLP® Core Reagent Kit	1,0 µl
		<b>26,0 µl</b>
Ligations – MIX :		
(RE-Puffer/Enzym-, Restriktions - MIX)	siehe oben	25,0 µl
(Adapter/Ligations - MIX)	siehe oben	25,0 µl
		<b>50,0 µl</b>
PCR-Programm: 'Ligation', 120 min bei 20°C		
<i>Ligationsverdünnung ( LV ): Ligationsansatz 1:10 mit TE 10/0,1</i>		

Tab. A7. AFLP-Präamplifikationsansätze.

<b>PRÄAMPLIFIKATION</b> ( <i>Präamplifikations – MIX</i> )	<b>Arbeits-/ Stammlösung</b>	<b>pro 50 µl- Ansatz</b>
Pre-amp Primer Mix		
Puffer (Qiagen, mit 15 mM MgCl <sub>2</sub> )	aus AFLP® Pre-amp Primer Mix	40,0 µl
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	[10x]	5,0 µl
<i>Taq</i> DNA Polymerase (Qiagen)	[5 U/µl]	0,8 µl
		0,2 µl
		<b>46,0 µl</b>
<i>Präamplifikationsansatz:</i>		
Ligationsverdünnung (LV)	[1:10]	5,0 µl
( <i>Präamplifikations – MIX</i> )		46,0 µl
		<b>51,0 µl</b>
PCR-Programm: 'Präamplifikation': 20 Zyklen (94°C 30 sec, 56°C 60 sec, 72°C 60 sec, 4°C hold)		
<i>Präamplifikationsverdünnung ( PV ): Präamplifikationsansatz 1:10 mit TE 10/0,1</i>		



Tab. A8. Selektive AFLP-Amplifikationsansätze.

<b>AMPLIFIKATION</b> ( <i>Amplifikations – MIX</i> )	<b>Arbeits-/ Stammlösung</b>	<b>pro 20µl- Ansatz</b>
<i>EcoRI</i> /IRD-Primer (markiert mit IRD700/ IRD800)	[50 ng/µl]	0,2 µl
<i>Mse</i> I-Primer	[50 ng/µl]	1,2 µl
dNTPs	[10 mM]	0,4 µl
Puffer (Qiagen, mit 15 mM MgCl <sub>2</sub> )	[10x]	2,0 µl
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>		11,2 µl
<i>Taq</i> -Polymerase		0,2 µl
		<b>15,2 µl</b>
<i>Amplifikationsansatz:</i>		
Präamplifikationsverdünnung (PV) ( <i>Amplifikations - MIX</i> )	[1:10]	5,0 µl
		15,0 µl
		<b>20,0 µl</b>
PCR-Programm: '3+Amplifikation': 1 Zyklus (94°C 45 sec, 65°C 60 sec, 72°C 80 sec), 12 Zyklen mit Verringerung der Annealing-Temperatur um 0,7°C pro Zyklus, 23 Zyklen (94°C 45 sec, 56°C 60 sec, 72°C 80 sec), 4°C hold		

Tab. A9. Mikrosatellitenansätze.

<b>MIKROSATELLITEN</b> ( <i>Mikrosatelliten - MIX</i> )	<b>Arbeits-/ Stammlösung</b>	<b>pro 15µl- Ansatz</b>
M13-Forward-Primer	[5 pmol/ µl]	0,15 µl
Reverse-Primer	[5 pmol/ µl]	0,15 µl
M13-IRD-Primer (markiert mit IRD700/ IRD800)	[5 pmol/ µl]	0,15 µl
dNTPs	[10 mM]	0,30 µl
Puffer (Qiagen, mit 15 mM MgCl <sub>2</sub> )	[10x]	1,50 µl
MgCl <sub>2</sub>	[25 mM]	0,60 µl
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>		8,10 µl
<i>Taq</i> -Polymerase (Qiagen)	[5 U/µl]	0,05 µl
		<b>11,00 µl</b>
<i>Mikrosatellitenansatz:</i>		
( <i>Mikrosatelliten - MIX</i> ) template - DNA	[5 ng/µl]	11,0 µl
		4,0 µl
		<b>15,0 µl</b>
PCR-Programm : 95°C 5 min, 36 Zyklen (95°C 20 sec, je nach Primerpaar 50-55-60°C 20 sec, 72°C 30 sec), 72°C 5 min, 4°C hold		

Tab. A10. RAPD-Ansätze.

<b>RAPD</b> (RAPD - MIX)	<b>Arbeits-/ Stammlösung</b>	<b>pro 20<math>\mu</math>l- Ansatz</b>
Primer	[5 pmol/ $\mu$ l]	1,5 $\mu$ l
dNTPs	[10 mM]	1,0 $\mu$ l
Puffer (Stoffel)	[10x]	2,0 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub>	[25 mM]	4,8 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>		5,6 $\mu$ l
<i>AmpliTaqStoffel</i>	[10 U/ $\mu$ l]	0,1 $\mu$ l
		<b>15,0 <math>\mu</math>l</b>
<i>RAPD-Ansatz:</i>		
(RAPD - MIX)		15,0 $\mu$ l
template - DNA	[5 ng/ $\mu$ l]	5,0 $\mu$ l
		<b>20,0 <math>\mu</math>l</b>
PCR-Programm: 94°C 4 min, 45 Zyklen (94°C 1 min, 36°C 1 min, 72°C 2 min*), 8°C hold *		
Verlängerung der Polymerisation um 3 sec pro Zyklus, Heizrate zwischen Annealing und Polymerisation begrenzt auf 5°C pro Minute		

Tab. A11. SCAR-Ansätze.

<b>SCAR</b> (SCAR - MIX)	<b>Arbeits-/ Stammlösung</b>	<b>pro 15<math>\mu</math>l- Ansatz</b>
WALK8F – Primer <sup>1)</sup>	[5 pmol/ $\mu$ l]	0,15 $\mu$ l
SCM08 – Primer <sup>1)</sup>	[5 pmol/ $\mu$ l]	0,15 $\mu$ l
dNTPs	[10 mM]	3,00 $\mu$ l
Puffer (Qiagen, mit 15 mM MgCl <sub>2</sub> )	[10x]	2,00 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub>	[25 mM]	1,50 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>		4,10 $\mu$ l
<i>Taq</i> -Polymerase (Qiagen)	[5 U/ $\mu$ l]	0,10 $\mu$ l
		<b>11,00 <math>\mu</math>l</b>
<i>SCAR-Ansatz:</i>		
(SCAR - MIX)		10,0 $\mu$ l
template - DNA	[10 ng/ $\mu$ l]	5,0 $\mu$ l
		<b>15,0 <math>\mu</math>l</b>
PCR-Programm : 1 Zyklus 94°C 3 min, 40 Zyklen (94°C 45 sec, 69°C 45 sec, 71°C 90 sec), 4°C hold		
<sup>1)</sup> Primersequenzen: SCM08: 5' –GAGCATCTAAACCGTCGTGCTTCC- 3'		
WALK8F: 5' –GCGCGTCCCCTTCCAGAAGTGAAC- 3'		

Tab. A12. Selektierte und benutzte AFLP-Primerkombinationen (*EcoRI* und *MseI* - Adapter/Primer).

Primer	M47	M48	M49	M50	M51	M58	M59	M60	M61	M62
E32	GÖY1Y2	GÖY1Y2	GÖY1Y2	GÖY1Y2			GÖY1Y2	Y1	GÖY1Y2	GÖY1Y2
E33	GÖY1Y2	GÖY1Y2	GÖY1Y2	GÖY1Y2			GÖY1Y2	Y1Y2	GÖY1Y2	GÖY1Y2
E35								GÖY1Y2		GÖY1Y2
E36					Y2					
E38							GÖY1Y2	Y1	GÖY1Y2	GÖY1Y2
E40						Y2		GÖY1Y2		
E41							Y2	Y1	Y1	Y1
E42	Y2									
E43					Y2					Y2
E44										Y2
E46							Y1Y2	Y1		

**Y1:** Primerkombination nur an YE1 getestet; **Y2:** Primerkombination nur an YE2 getestet; **Y1Y2:** Primerkombinationen an YE1 und YE2 getestet; **GÖY1Y2:** Primerkombination an 'Mansholts' (DH 11.4) x 'Samourai' (DH 5.1) der Universität Göttingen, YE1 und YE2 getestet.

Tab. A13. Mikrosatelliten(SSR)-Primerpaare aus der *Brassica*-DB (<http://ukcrop.net/perl/ace/search/BrassicaDB>) mit <sup>1)</sup>Kodierungskürzel der Abb. 10-14.

Position Chromosom	SSR	Position Chromosom	SSR	Position Chromosom	SSR
Chr 1A <sup>1)</sup>	OI12-F11	Chr 8A <sup>1)</sup>	Ra2-E12	Chr 13E <sup>1)</sup>	Na12-C07
Chr 1B	Na10-B04	Chr 8B	OI13-C12	Chr 14A	Na10-F06
Chr 1C	Na12-C06	Chr 8C	OI12-G04	Chr 14B	Na14-E11
Chr 1D	Na14-D07	Chr 9A	Na14-C12	Chr 14C	OI10-G08
Chr 2A	OI10-A05	Chr 9B	Na12-E06A	Chr 14D	Na14-E08
Chr 3A	OI11-B05	Chr 9C	Ni4-E08	Chr 14e	Na12-E05
Chr 3B	Na10-D03	Chr 10A	OI11-B03	Chr 15A	OI10-G09
Chr 3C	Na14-G02	Chr 10B	Ra2-E03	Chr 15B	Na10-G06
Chr 3D	OI13-D02A	Chr 10C	Ra2-E07	Chr 15C	Na10-B08
Chr 4A	OI11-H02	Chr 11A	Na12-H04	Chr 16A	Na10-C06
Chr 5A	Na10-E02	Chr 11B	OI10-F11	Chr 16B	Ni2-A11
Chr 5B	Ra3-H10	Chr 11C	Ra3-E05	Chr 17A	Na12-F03
Chr 5C	Ra2-A04	Chr 12A	Na12-H09	Chr 17B	Ra3-C04
Chr 6A	Ra2-D04	Chr 12B	OI10-H02	Chr 17C	OI11-C02
Chr 6B	Ra1-F06	Chr 12C	Na12-A07	Chr 18A	OI10-H07
Chr 6C	Na12-A08	Chr 12D	Na12-C03	Chr 18B	OI12-D05
Chr 6D	Na12-D04	Chr 13A	Ra2-E11	Chr 19A	Ra2-E01
Chr 7A	Ra2-A01	Chr 13A	Na10-C01	Chr 19B	OI12-A04
Chr 7B	OI12-E03	Chr 13B	Na12-D03	Chr 19C	OI13-C03
Chr 7C	Na12-A02	Chr 13C	Na14-E02	Chr 19D	Ra2-F11

Kodierungsbeispiele für SSR-Primerpaare in den genetischen Karten (Abb. 10-14):

SSR-**Chr1A**-... = SSR-**OI12-F11**-..., SSR-**Chr17C**-... = SSR-**OI11-C02**-...

SSR-**M**-... : von der Saaten-Union zur Verfügung gestellte SSR-Primerpaare

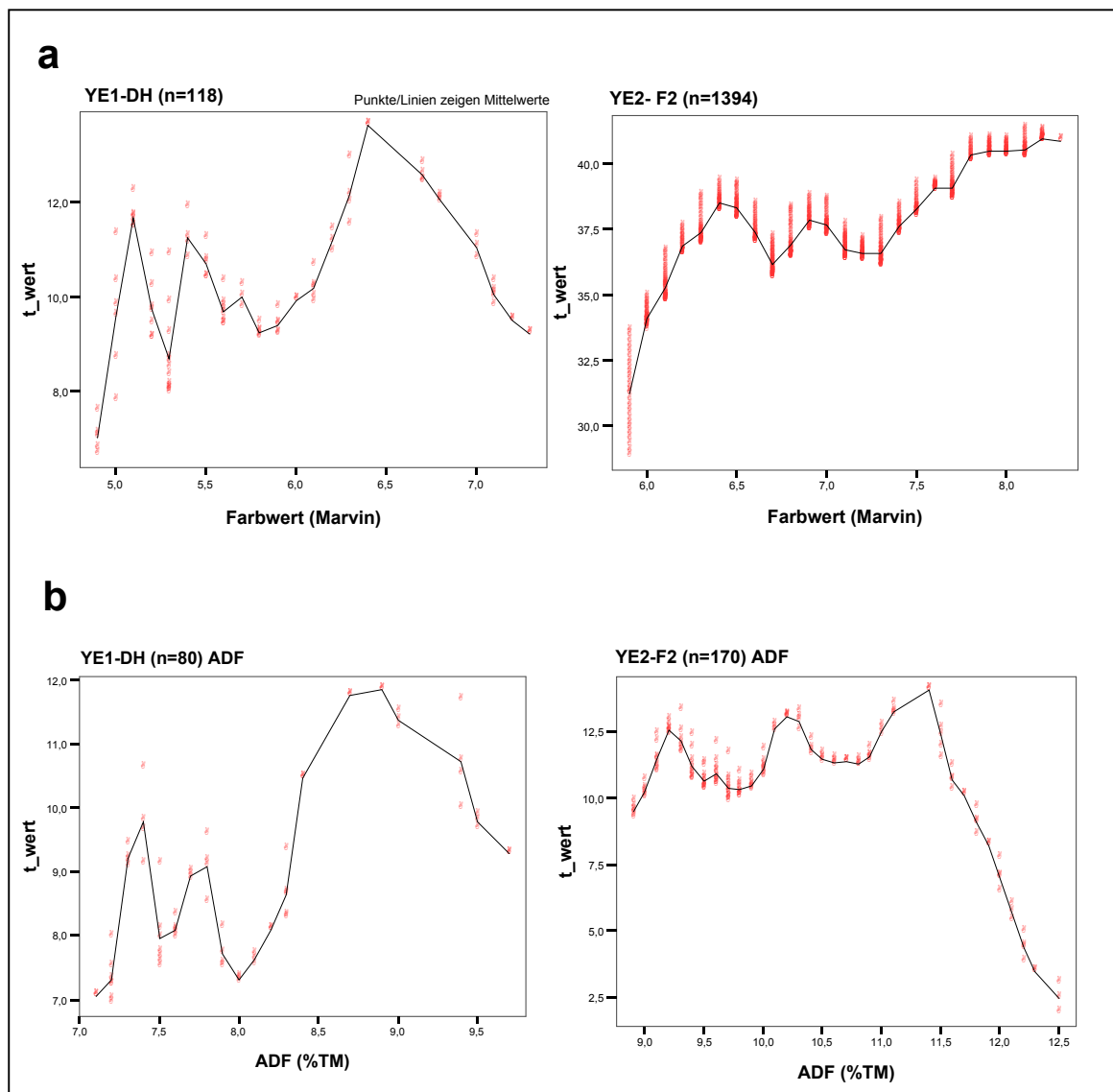


Abb. A1. Verlauf der maximalen t-Werte bei Variation der Trennpunkte in der verwendeten Segmentierungsprozedur für (a) Samenfarbe und (b) ADF-Gehalt in den Populationen YE1 und YE2.

## 10. DANKSAGUNG

Bei Herrn Prof. Friedt möchte ich mich ganz herzlich für die Überlassung des Promotionsthemas bedanken, sowie für die Möglichkeit, am Institut für Pflanzenbau- und Pflanzenzüchtung I in Gießen arbeiten zu können. Herrn Prof. Wolfgang Köhler als zweiten Gutachter danke ich sehr für die Übernahme des Koreferates.

Für die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit möchte ich mich zunächst bei meiner ersten Betreuerin, Renate Horn, für ihre Unterstützung in der ‚start up‘-Phase meiner Promotion bedanken. Für die Initiative zum Anstoß dieser Arbeit sowie die fruchtbaren Diskussionen und stete Unterstützung während der Doktorarbeit danke ich Wilfried Lühs und Roland Baetzel vielmals - letzterem auch wegen seiner Funktion als Herbergsvater in den ersten Wochen meiner Gießener Zeit. Mein besonderer Dank gilt Rod Snowdon, der mich mit seiner engagierten Betreuung, Hilfsbereitschaft und vertrauensvollen Art bis zur Fertigstellung der vorliegenden Arbeit bestens begleitete.

Danken möchte ich Antonio De Haro und Rafael Font aus dem CSCI in Cordoba, Spanien, sowie Benjamin Wittkopp für ihre Beiträge rund um die ADF zu meiner Promotion. In Fragen zur statistischen Auswertung der Daten unterstützten mich Jutta Ahlemeyer, Jörn Pons-Kühnemann und Gabriel Schachtel vom hiesigen Lehrstuhl für Biometrie, während Wolfgang Ecke von der Uni Göttingen immer ein offenes Ohr für Kartierungsfragen für mich hatte. Selbiges trifft bezüglich der QTL-Analysen für Thomas Presterl zu. Den Firmen KWS und DSV danke ich für die Bereitstellung der Raps-DNA-Proben.

Weiterhin danke ich allen, die mir bei der praktischen Durchführung meiner Arbeit geholfen haben, insbesondere den technischen Assistenten – hier allen voran Daniela Baetzel, der Spezialistin für Probenhochdurchsatz und DNA-Sortieren; ich werde nie vergessen, wie viele Praktikanten und Studenten dabei mit uns gearbeitet haben. Des Weiteren Stavros Stzigos, der mit seiner freundlichen und zuvorkommenden Art eine optimale Arbeitsatmosphäre und gute griechische Laune verbreitete.

Meinen Bürokollegen und Freunden möchte ich für angeregte und anregende Diskussionen, fachliche Auseinandersetzungen und regelmäßige Ablenkung (Laufen, Kochen, Wäschewaschen, Bier-, Wein- und Teetrinken, ungeplant erotische Kinofilme, Fußball mit den Phytos, Grillen, ...) danke sagen – dem Alphabet nach Katrin Humberich, Monica Osnaya, Stephan Rönicke, Mechthild Schuppener, Christof Stoll, Carola Wagner und allen anderen. Den Sekretärinnen Ulla Riedmayer, Ingeborg Scholz und Sabine Schomber, die durch ihren persönlichen Einsatz das Unmögliche möglich machen, sei besonders herzlich gedankt.

Meiner Familie in Bolivien möchte ich von ganzem Herzen danken für ihre Liebe und Unterstützung, die ich über tausende von Kilometern gespürt habe. Meiner zweiten Familie aus Bogen bin ich zu tiefst verbunden, weil sie mir mit ihrer Liebe und Wärme Rückhalt in jeder Lebenslage gegeben hat. Letztendlich danke ich Klaus Dehmer dafür, dass er zu jeder Zeit mit Geduld, Verständnis und mehr für mich da war.

***Eidesstattliche Erklärung***

„Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Die Stellen, die anderen Werken wörtlich oder sinngemäß entnommen sind, sind als solche kenntlich gemacht. Ich versichere weiterhin, dass die Arbeit in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegen hat.“

Gießen, den 17. Juni 2005