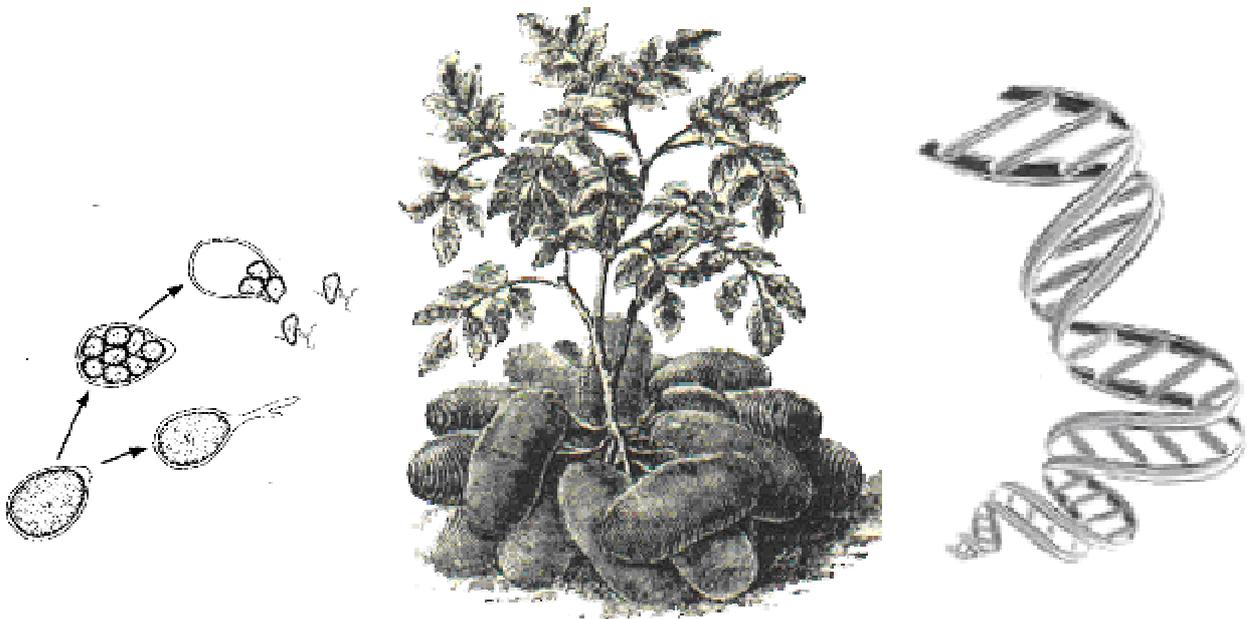


**Entwicklung und Analyse von  
SNP-Markern  
(*single nucleotide polymorphisms*)  
in  
Pathogenresistenz-vermittelnden Regionen  
des Kartoffelgenoms**



**Inaugural-Dissertation**  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von  
**Andreas Marcus Rickert**  
aus Menden (Sauerland)

Köln 2002

Die vorliegende Arbeit wurde durchgeführt am



**Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung**

Köln

Abteilung: Prof. Dr. Francesco Salamini

Arbeitsgruppe: PD Dr. Christiane Gebhardt

und am



**Stanford Genome Technology Center**

Stanford University, Palo Alto, Kalifornien, USA

Direktor: Prof. Dr. Ron Davis

Arbeitsgruppe: Prof. Dr. Peter Oefner.

Berichterstatter: PD Dr. Christiane Gebhardt  
Prof. Dr. Diethard Tautz

Tag der mündlichen Prüfung: 28. November 2002

**Für meine Eltern und Geschwister**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1.	Die Kartoffel	1
1.2.	<i>P. infestans</i> und die Kraut- und Knollenfäule	2
1.3.	Pflanzliche Resistenz	3
1.4.	QTL-Analysen	7
1.4.1.	Kartierung von DNA-Markern	8
1.4.2.	Aufbau von QTL-Analysen	8
1.5.	Genotypisieren von Polymorphismen	10
1.5.1.	Methoden zum Genotypisieren	10
1.5.1.1.	<i>BigDye-Sequencing</i>	11
1.5.1.2.	PCR-basierte Genotypisierungsmethoden	11
1.5.1.3.	<i>Minisequencing</i>	12
1.5.1.4.	Allelspezifische Hybridisierung auf DNA-Chips	12
1.5.1.5.	Primer-Elongation auf DNA-Chips	13
1.5.1.6.	<i>Pyrosequencing</i>	14
1.5.2.	Genotypisieren von Polymorphismen in polyploiden Organismen	15
1.6.	Ziele und Strategien dieser Arbeit	15
1.6.1.	Identifizierung und Analyse von SNPs in RGL-Kandidatenregionen	16
1.6.2.	Evaluierung und Optimierung von Methoden zum quantitativen Genotypisieren von SNPs in polyploiden Organismen	17
1.6.3.	QTL-Analyse zur quantitativen Resistenz gegen <i>P. infestans</i>	17
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>19</b>
2.1.	Chemikalien, Enzyme und Oligonukleotide	19
2.2.	Medien und Lösungen	19
2.3.	Molekularbiologische Standardmethoden	20
2.3.1.	Isolierung von genomischer DNA und von Plasmid-DNA	20
2.3.2.	Konzentrationsbestimmung von DNA	21
2.3.3.	Polymerase-Ketten-Reaktionen (PCR)	21
2.3.4.	DNA-Sequenzierung	22
2.4.	Identifizierung und Analyse von Polymorphismen in RGL-Kandidatenregionen	23
2.4.1.	Identifizierung von RGL-Kandidatenregionen	23
2.4.1.1.	<i>Screening</i> einer BAC-Bibliothek	23
2.4.1.2.	Kartierung von BAC-Insertionen	26
2.4.2.	Identifizierung von Polymorphismen in RGL-Kandidatenregionen	27
2.4.2.1.	Pflanzenmaterial zur Identifizierung von Polymorphismen	27

---

2.4.2.2.	Vergleichendes Sequenzieren und Sequenzanalyse	29
2.4.2.3.	Dokumentation und Analyse von SNPs und Indels	29
2.5.	Methoden zum Genotypisieren von Polymorphismen	30
2.5.1.	<i>BigDye-Sequencing</i>	30
2.5.2.	PCR-basierte Genotypisierungsmethoden	30
2.5.3.	SNuPE in Kombination mit DHPLC ( <i>Minisequencing</i> )	31
2.5.3.1.	Primer-Extension	31
2.5.3.2.	DHPLC	31
2.5.3.3.	Kalibrierung und Auswertung der SNuPE-Reaktionen	32
2.5.4.	Allelspezifische Hybridisierung auf DNA-Chips	33
2.5.4.1.	Erstellen der DNA-Chips für die allelspezifische Hybridisierung	33
2.5.4.2.	Amplifizierung und Markierung der Zielsequenzen	34
2.5.4.3.	Hybridisierung und Waschen	34
2.5.4.4.	Auswertung der allelspezifischen Hybridisierung auf DNA-Chips	35
2.5.5.	Primer-Elongation auf DNA-Chips	35
2.5.5.1.	Erstellen der DNA-Chips für die Primer-Elongation	35
2.5.5.2.	Amplifizierung der Zielsequenzen	35
2.5.5.3.	Primer-Elongation auf DNA-Chips ( <i>solid phase PCR</i> )	35
2.5.5.4.	Auswertung der Primer-Elongation auf DNA-Chips	36
2.5.6.	<i>Pyrosequencing</i>	36
2.5.6.1.	Präparation von einzelsträngiger DNA und Binden des Sequenzier-Primers	36
2.5.6.2.	Entwerfen der Sequenzier-Primer	37
2.5.6.3.	<i>Pyrosequencing</i> -Reaktion	37
2.5.6.4.	Auswertung der <i>Pyrosequencing</i> -Reaktion	38
2.5.6.5.	Verwendung von SSB	38
2.6.	QTL Analyse	38
2.6.1.	Pflanzenmaterial und Feldversuche für die QTL Analyse	38
2.6.2.	Genotypisierungsdaten	40
2.6.3.	Statistische Auswertungen	40
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>42</b>
3.1.	Identifizierung und Analyse von SNPs in RGL-Kandidatenregionen	42
3.1.1.	Identifizierung von RGL-Kandidatenregionen	42
3.1.2.	SNPs und Indels in RGL-Kandidatenregionen	46
3.2.	Methoden zum quantitativen Genotypisieren von Polymorphismen in polyploiden Organismen	50
3.2.1.	<i>BigDye-Sequencing</i>	50
3.2.2.	PCR-basierte Genotypisierungsmethoden	52

---

3.2.3.	SNuPE in Kombination mit DHPLC ( <i>Minisequencing</i> )	52
3.2.4.	Allelspezifische Hybridisierung auf DNA-Chips	58
3.2.5.	Primer-Elongation auf DNA-Chips	63
3.2.6.	<i>Pyrosequencing</i>	65
3.3.	QTL-Analyse zur quantitativen Resistenz gegen <i>P. infestans</i>	72
3.3.1.	Untersuchungspopulation	72
3.3.2.	Phänotypische Daten	72
3.3.3.	Genotypisierungsdaten	75
3.3.4.	QTL-Analyse	76
3.3.4.1.	Korrelationsanalyse	76
3.3.4.2.	Regressionsanalyse	80
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>90</b>
4.1.	Variabilität des Kartoffelgenoms in RGL-Regionen	90
4.2.	Methoden zum quantitativen Genotypisieren von Polymorphismen in polyploiden Organismen	94
4.3.	QTL-Analyse zur quantitativen Resistenz gegen <i>P. infestans</i>	101
4.3.1.	Identifizierte QTLs	102
4.3.2.	Überlegungen zur genetischen Struktur quantitativer Resistenzgene	107
4.3.3.	Beurteilung der gewählten Strategien zur Analyse von quantitativen Merkmalen	110
4.4.	Ausblick	112
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>113</b>
<b>6.</b>	<b>Abstract</b>	<b>115</b>
<b>7.</b>	<b>Literatur</b>	<b>117</b>
<b>8.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>122</b>
<b>9.</b>	<b>Anhang</b>	<b>123</b>
9.1.	Oligonukleotide, Reaktionsbedingungen und Klone	123
9.2.	SNP-Dokumentationen und Sequenzen	137
9.3.	Eidesstattliche Erklärung	138
9.4.	Veröffentlichungen aus dieser Arbeit	139
9.5.	Danksagung	140
9.6.	Lebenslauf	141

# 1. Einleitung

## 1.1. Die Kartoffel

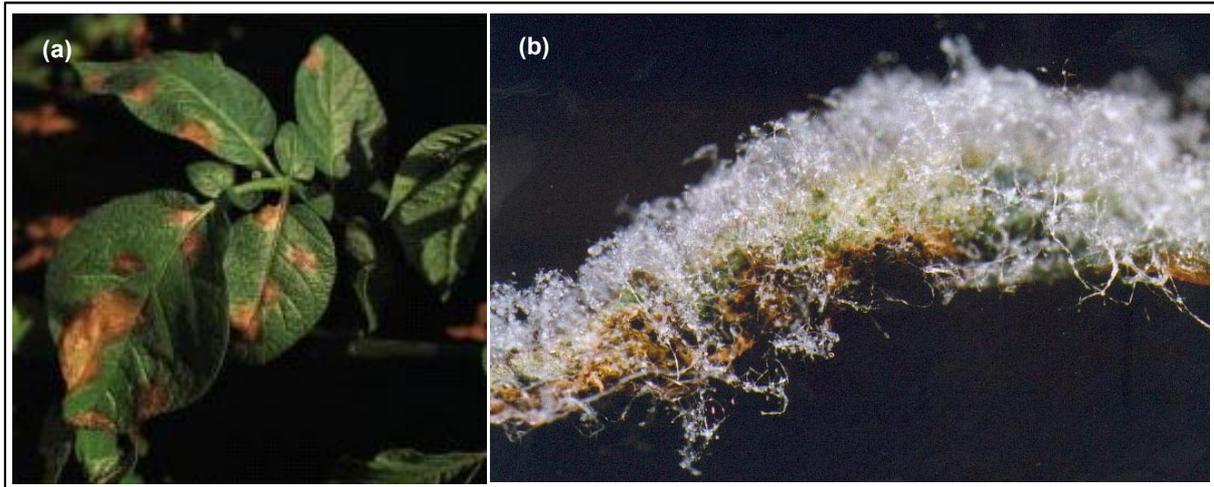
Die Kartoffel zählt heute mit einer Jahresproduktion von ca. 300 Millionen Tonnen zu den wichtigsten Nutzpflanzen der Erde; lediglich Weizen, Mais und Reis weisen einen größeren Ertrag auf (Hawkes, 1990). Die Produktion erfolgt hauptsächlich für den direkten Verzehr, für die weiterverarbeitende Lebensmittelindustrie (z.B. für Frittierprodukte) oder zur Stärkegewinnung.

Sowohl der evolutionäre als auch der kulturelle Ursprung der Kartoffel liegt in Südamerika. Archäologische Befunde belegen, dass sie bereits vor 7000 Jahren als Nahrungsmittel in der Andenregion genutzt wurde (Hawkes, 1990), der restlichen Welt allerdings bis zur Eroberung der ‚Neuen Welt‘ unbekannt blieb. Nach Europa wurde die Kartoffel wahrscheinlich zweimal unabhängig voneinander eingeführt, ca. 1570 nach Spanien und etwa 1590 nach England (Hawkes, 1990). Es dauert allerdings bis zum Ende des 18. Jahrhunderts, bis durch ein Zusammenspiel von natürlicher Selektion und unbewusster Züchtung aus der an einen Kurztag angepassten Pflanze eine an den Langtag Mittel- und Nordeuropas adaptierte Nutzpflanze evolviert war. Hierdurch war der Weg für ertrag- und somit umfangreichen Anbau geebnet, welcher sich dann auch rasch über die verschiedenen Kontinente ausbreitete. Ein Vergleich der wichtigsten Kulturpflanzen bezüglich der Produktionssteigerungen deutet darauf hin, dass die Kartoffel insbesondere in asiatischen Entwicklungsländern weiterhin stark an Bedeutung gewinnt (Maldonado *et al.*, 1998).

Systematisch betrachtet gehört die Kartoffel zur großen und formenreichen Familie der *Solanaceae*, zu der auch andere wichtige Nutzpflanzen wie Tomate (*Lycopersicon esculentum*), Paprika (*Capsicum annuum*) und Tabak (*Nicotiana tabacum*) zählen. Bisher sind über 200 wilde und acht kultivierte knollenbildende *Solanum* Arten beschrieben worden (Hawkes, 1990). Es wird angenommen, dass wenigstens vier Wildarten der zentralen Anden in die Kulturpflanzen eingegangen sind: *S. acaule*, *S. sparsipilum*, *S. leptophyes* und *S. megistacrolobum* (Hawkes, 1994). Die verschiedenen Kartoffelarten unterscheiden sich unter anderem in ihrem Polyploidiegrad. Da der haploiden Chromosomensatz 12 beträgt, weisen die Arten jeweils Vielfache dieser Basisanzahl als Chromosomenanzahl auf; von diploide (2x12) bis hexaploide (6x12) Genome sind zu unterscheiden. Bei der in Europa angebauten Kulturform handelt es sich beispielsweise um die tetraploide *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*. Die diploiden Arten sind fast ausschließlich selbstinkompatibel (gametophytische Selbstinkompatibilität), wohingegen einige tetra- und hexaploiden Arten Selbstkompatibilität zeigen. Tri- und pentaploide Arten sind steril (Hawkes, 1994).

## 1.2. *P. infestans* und die Kraut- und Knollenfäule

Eine Epidemie der Kraut- und Knollenfäule (engl. *late blight*) führte in den Jahren 1845/46 in Irland zu einer verheerenden Hungersnot. Über 200 000 Menschen verhungerten und weitere anderthalb Millionen wanderten aus, vorwiegend nach Nordamerika (Scheffer, 1997). Auch heute zählt diese Phytokrankheit zu einer der bedeutendsten bei der Kartoffel. Sie verursacht jährlich zwei bis drei Millionen Dollar Verluste und erfordert massiven Pestizideinsatz zur Kontrolle (Kamoun *et al.*, 2001).



**Abb. 1-1:** Mit *P. infestans* infizierte Kartoffelblätter. In (a) sind die charakteristischen braunen Flecken eines befallenen Blattes und in (b) die hyphenartigen Netzwerke von *P. infestans* auf einem Kartoffelblatt zu sehen.

Ausgelöst wird die Kraut- und Knollenfäule von dem Oomyzeten *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. Da *P. infestans* und andere Oomyzeten – analog zu Pilzen – Netzwerke aus Hyphen bilden (Abb. 1-1-b) und sich über Sporen vermehren (Abb. 1-2), wurden sie ursprünglich zu den Mycota gezählt. Sequenzvergleiche genomischer DNA (Cooke *et al.*, 2000; Goovers, 2001) unterstützen allerdings eine nähere Verwandtschaft zu Braunalgen, so dass *P. infestans* bei den Stramenophiles (Reich: Protocista) eingegliedert werden muss.

Ebenfalls aufgrund von Sequenzvergleichen wird der geographische Ursprung neu diskutiert. So sprechen Untersuchungen mitochondrialer DNA von rezenten Pathogenen und archäologische Funde für einen Ursprung in Südamerika, also dem Ursprungsland der Wirtspflanze (Ristaino *et al.*, 2001). Die zuvor primär vertretene Theorie ging von einer Koevolution in Mexiko aus. Diese Auffassung wurde vor allem durch folgende Beobachtung gestützt: Bei *P. infestans* sind für die sexuelle Reproduktion zwei Paarungstypen A1 und A2 erforderlich. Der Paarungstyp A2 trat bis in die 80-iger Jahre allerdings ausschließlich in Mexiko auf (Goodwin *et al.*, 1994). Innerhalb der folgenden zehn bis 15 Jahre hat sich dieser Paarungstyp weltweit verbreitet (Frey *et al.*, 1993). Somit ist also auch außerhalb Mexikos sexuelle Rekombination möglich, was zu einer größeren genetischen Variabilität bei *P. infestans* führt. Dies ist insbesondere für die Züchtung resistenter Kartoffelpflanzen



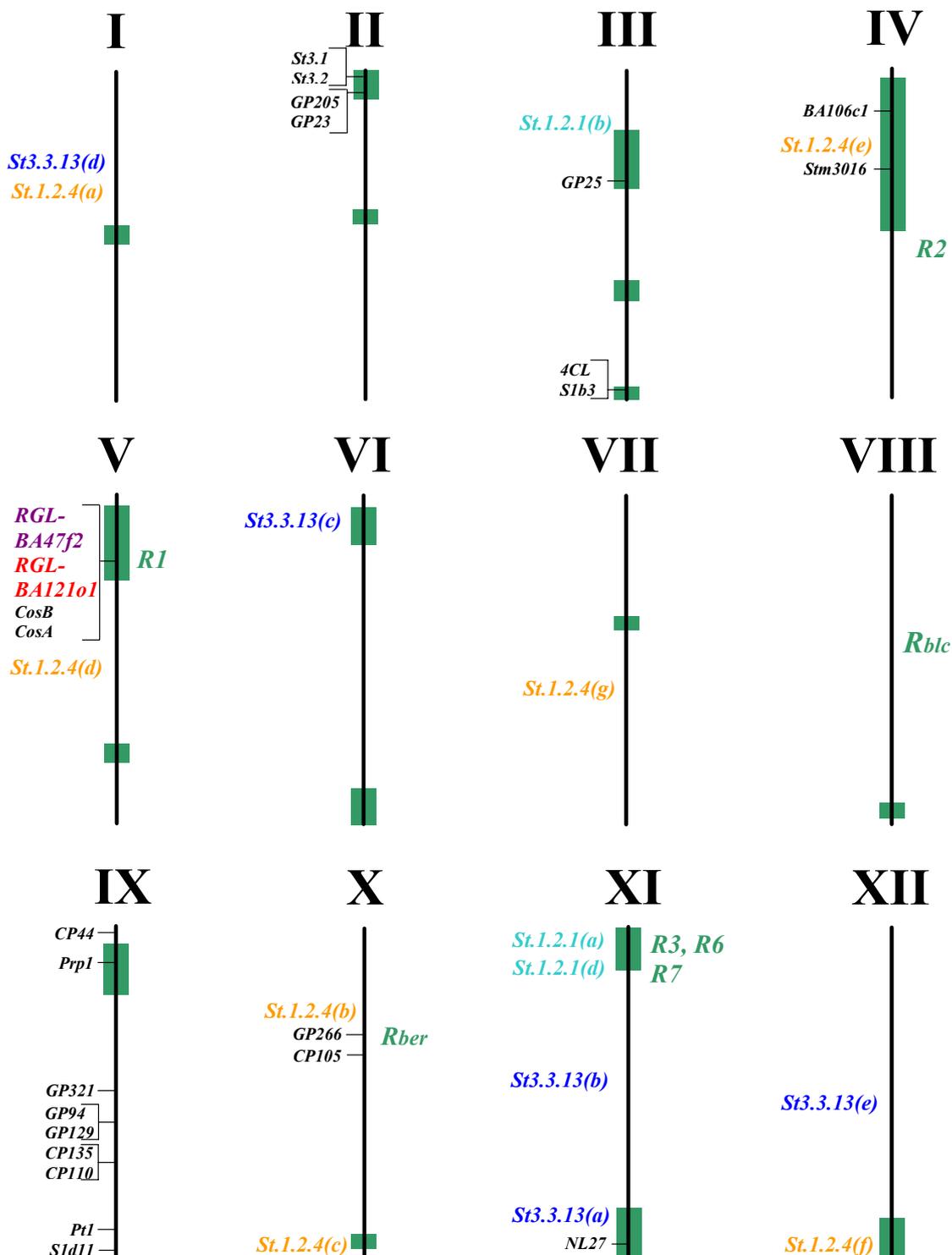
für das spezielle Pathogen anfällig (suszeptibel). Erfolgt hingegen eine spezifische Wechselwirkung, werden über Signaltransduktionskaskaden eine Reihe von Genen zur Einleitung von vielseitigen Abwehrreaktionen reguliert (Reviews: Hammond-Kosack und Jones, 1996; Somssich und Hahlbrock, 1998; Glazebrook, 1999; Pieterse und van Loon, 1999; Feys und Parker, 2000). So kann es zur Verstärkung der Zellwände durch Kallose-Ablagerungen und erhöhte Lignifizierung kommen. Häufig wird auch die Bildung von PR-Proteinen (*pathogenesis related*) induziert. Unter diesem Begriff wird eine Vielzahl von Proteinen zusammengefasst; beispielsweise zeigen von diesen einige antimikrobielle Aktivitäten, während von anderen die Funktion allerdings noch ungeklärt ist. Eine charakteristische Abwehrreaktion ist auch das lokale Absterben von Zellen (Nekrosen) an der Infektionsstelle. Diese so genannte „hypersensitive Antwort“ (*hypersensitive response*, HR) bewirkt eine lokale Begrenzung der Infektion und verhindert somit seine Ausbreitung.

Bisher konnten ca. 30 *R*-Gene in verschiedenen Pflanzen durch positionelle Klonierung oder Insertions-Mutagenese isoliert werden (Reviews: Staskawicz *et al.*, 1995; Bent, 1996; Hammond-Kosack und Jones, 1997; Gebhardt, 1997; Ellis *et al.*, 2000). Die geklonten *R*-Gene sind gegen verschiedene Pathogene (Viren, Bakterien, Nematoden und Pilze) gerichtet. Dennoch zeigen sie strukturelle Ähnlichkeiten, anhand derer sie sich in vier Gruppen einteilen lassen (Gebhardt und Valkonen, 2001). (1) Die meisten *R*-Gene weisen eine *nucleotide binding site* (NBS) oder CheY-Domäne zusammen mit *leucine-rich repeats* (LRR) auf (NBS/CheY-LRR-Gene). Als Subgruppen können noch NBS/CheY-LRR-Gene mit und ohne TIR-Domäne unterschieden werden (Young, 2000) (2) Die LRR-Domäne kann auch in Kombination mit Protein-Kinasen auftreten (PK-LRR-Gene). (3) Ferner gibt es *R*-Gene, die lediglich die LRR-Domäne als gemeinsame Struktur aufweisen (LRR-Gene). (4) Und schließlich sind Protein-Kinasen ohne LRR-Domäne als *R*-Gene identifiziert worden (PK-Gene). Entsprechend der oben ausgeführten Abwehrmechanismen wird angenommen, dass die Proteine der *R*-Gene als Rezeptoren oder *downstream*-Komponenten in Signaltransduktionsketten fungieren (Martin, 1999).

Bezüglich der genomischen Organisation von Resistenzgenen fällt auf, dass diese häufig eng gekoppelt in Clustern mit mehreren Homologen auftreten. Solche Cluster evolvieren wahrscheinlich ausgehend von einem Ursprungsgen durch Genduplikationen, gefolgt von Diversifikationen (Pryor und Ellis, 1993; Michelmore und Meyers, 1998; Gebhardt und Valkonen, 2001).

Auch gegen die Kraut- und Knollenfäule gibt es qualitative Resistenzen. So wurden bisher insgesamt elf *R*-Gene beschrieben, welche jeweils bei spezifischen Rassen von *P. infestans* eine „hypersensitive Antwort“ induzieren (Malcolmson und Black, 1966). Wie Abbildung 1-3 zu entnehmen ist, konnten allerdings noch nicht alle *R*-Gene kartiert werden (Gebhardt und Valkonen, 2001). *R1*, *R2*, *R3*, *R6* und *R7* stammen alle von der hexaploiden Wildsorte

*Solanum demissum*, *R<sub>ber</sub>* von *Solanum berthaultii* (Ewing *et al.*, 2000) und *R<sub>blc</sub>* von *Solanum bulbocastanum* (Naess *et al.*, 2000). Als erstes dieser Gene konnte kürzlich *R1* kloniert werden (Ballvora *et al.*, 2002). Hierbei handelt es sich um ein NBS-LRR-Gen mit Leuzin-Zipper-Motif.



**Abb. 1-3: Genetische Funktionskarte der Kartoffel zur Resistenz gegen *P. infestans*.** Bereits bekannte QTLs und kartierte *R*-Gene gegen *P. infestans* sind in dunkelgrün eingetragen. Die Kartierungspositionen der zum Screenen der BAC-Bibliothek genutzten Sonden *RGL-BA121o1*, *RGL-BA47f2*, *St.1.2.1*, *St.1.2.4* und *St.3.3.13* sind eingezeichnet. Des Weiteren sind Markerpositionen dargestellt, welche ebenfalls in die Untersuchungen zur genetischen Variabilität und in die QTL-Analyse eingegangen sind.

**Quantitative Resistenz und QTL.** Die quantitative („horizontale“, polygene) Resistenz (auch Feldresistenz genannt) ist durch das Zusammenwirken vieler Gene charakterisiert. Quantitative Merkmale zeigen in Populationen eine kontinuierliche phänotypische Variation, welche zum einen durch Umwelteinflüsse und zum anderen durch die kombinierten Effekte der beteiligten Gene beeinflusst wird. Diese genetischen Loci mit Einfluss auf das quantitative Merkmal werden als *quantitative trait loci* (QTLs) bezeichnet (Geldermann, 1975).

Über die zugrunde liegenden molekularen und physiologischen Eigenschaften der quantitativen Resistenzreaktionen gibt es keine Erkenntnisse. Auch konnten bisher noch kein QTL-Resistenzgen kloniert und charakterisiert werden. Es wird allerdings diskutiert, dass diese Gene den gleichen Genklassen wie die *R*-Gene zuzuordnen sind, oder sogar den *R*-Genen entsprechen und es sich lediglich um Allele dieser handelt (Robertson, 1985, 1989; Leonard-Schippers *et al.*, 1994; Pflieger *et al.*, 2001). Diese These wird auch durch die Beobachtung gestützt, dass bei der Kartoffel eine Reihe von QTLs für Resistenzen gegen *P. infestans*, Nematoden und Bakterien mit Loci für *R*-Gene gekoppelt sind (Gebhardt und Valkonen, 2001; siehe auch Kap. 1.6.2.).

Zur quantitativen Resistenz gegen *P. infestans* sind Marker-gestützte Analysen (siehe auch Kap. 1.4.) mit mehreren diploiden Kartierungspopulationen (Leonard-Schippers *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1998; Collins *et al.*, 1999; Oberhagemann *et al.*, 1999; Ewing *et al.*, 2000; Sandbrink *et al.*, 2000 Ghislain *et al.*, 2001;) und an einer tetraploiden Kartierungspopulation (Meyer *et al.*, 1998) durchgeführt worden. Entsprechend dem Prinzip des Zusammenwirkens vieler Gene ist eine Vielzahl von QTLs – auf beinahe allen Kopplungsgruppen – identifiziert worden (Abb. 1-3). Einige der QTLs wurden unabhängig voneinander in mehreren der untersuchten Populationen in ähnlichen Positionen kartiert. Aufgrund dieser Übereinstimmungen können QTLs auf den Chromosomen III, V und VI als die am besten reproduzierbaren eingestuft werden, wobei insbesondere die Region mit dem qualitativen *R1*-Gens auf Chromosom V (s.o.) auch die dominierensten quantitativen Effekte zeigt (Gebhardt und Valkonen, 2001).

**Züchterische Aspekte der Resistenz gegen *P. infestans*.** Für die angewandte Züchtung ist die qualitative Resistenz von untergeordneter Bedeutung, da - gemäß der Gen-für-Gen Hypothese (Kap. 1.3.1.) - eine einzige Veränderung des spezifischen *Avr*-Gens zur Überwindung der Resistenzwirkung genügen kann (Ross, 1986). So wurden beispielsweise zur Züchtung resistenter Kartoffelsorten in den 20-iger Jahren des vergangenen Jahrhunderts gezielt *R*-Gene aus *Solanum demissum* in Kultursorten eingekreuzt. Zunächst standen hiermit gegen *P. infestans* resistente Sorten zur Verfügung. Allerdings wurden diese bereits 1932 erneut von dem Pathogen befallen (Müller, 1935). Dementsprechend wird der

quantitativen Resistenz eine größere Bedeutung beigemessen, da sie aufgrund des polygenen Charakters nicht so leicht durch das Pathogen überwunden werden kann. Allerdings ist die Zucht neuer, quantitativ resistenter Sorten auf der Basis konventioneller phänotypischer Selektion schwierig und zeitaufwendig, so dass hierbei der Einsatz Marker-gestützter Selektion (*marker assisted selection*, MAS) (Young, 1999) auf der Basis identifizierter QTLs sinnvoll erscheint.

Beim einem Vergleich von QTL-Analysen zur quantitativen Resistenz mit QTL-Analysen zum Reifeverhalten fällt auf, dass - bezüglich der QTLs auf den Chromosomen V und VI - die Merkmale quantitative Resistenz und Spätreife miteinander assoziiert sind, d.h., dass früh reifende Sorten anfälliger gegen Befall durch *P. infestans* sind (Collins *et al.*, 1999; Oberhagemann *et al.*, 1999). Diese Korrelation, deren molekulare Ursache nicht bekannt ist, erweist sich für die Züchtung als problematisch, da Sorten gewünscht sind, die einerseits resistent sind, andererseits aber früh reifen.

## 1.4. QTL-Analysen

QTL-Analysen basieren auf der Idee durch die Korrelation von Genotypisierungsdaten mit phänotypischen Werten Erkenntnisse über Anzahl und genetische Positionen von Genen zu erlangen, welche einen Einfluss auf das quantitative Zielmerkmal haben (*Reviews*: Tanksley, 1993; Lander und Schork, 1994; Byrne und McMullen, 1996; Young, 1996, 1999; Helentjaris und Heun, 1994; Schafer und Hawkins, 1998; Zhao, 1998; Johnson und Todd, 2000; Flint und Mott, 2001; Kearsley und Farquhar, 2001; Mackay, 2001; Barton und Keightley, 2002; Doerge, 2002). Des Weiteren ist von Interesse, welchen effektiven Anteil die einzelnen Loci an der Ausprägung des Merkmals haben. Letztlich können dann die erhaltenen Kartierungsinformationen zur genauen molekularen und funktionellen Charakterisierung der QTL-Gene – und ihrer allelischen Variationen, welche letztlich die molekulare Basis der differentiellen Phänotypen darstellen – führen.

Quantitative Merkmale und deren Untersuchungen stehen schon lange im Focus genetischer Forschung. Dies gilt insbesondere für die Pflanzengenetik, da viele agronomisch wichtige Merkmale eine quantitative phänotypische Ausprägung aufweisen. Bereits 1923 wurden von Sax Kopplungsanalysen zu quantitativen Effekten durchgeführt. Allerdings wurden genaue QTL-Analysen erst möglich, nachdem mit Hilfe von DNA-basierten MTL-Markern die QTL-Effekte in einzelne genetische Faktoren (Loci) zergliedert und diese kartiert werden konnten (Paterson *et al.*, 1988). Auf der Basis solcher Erkenntnisse konnten Fridman *et al.* (2000) erstmals mit einem Invertasegen ein QTL mit Einfluss auf den Zuckergehalt in Tomate klonieren.

### 1.4.1. Kartierung von DNA-Markern

Für Kartierungsarbeiten war zunächst die technische Entwicklung von effektiven DNA-Markern erforderlich. Bei polyploiden Organismen war zusätzlich die Einführung von Methoden zur Manipulation des Polyploidiegrads von entscheidender Bedeutung. Die Induktion der parthenogenetischen Entwicklung von weiblichen Gameten (Hougas *et al.*, 1964; Hermsen *et al.*, 1973) oder die Regeneration von männlichen Gameten (Dunwell *et al.*, 1973; Powell *et al.*, 1987) ermöglicht es, tetraploide Genome auf den diploiden Satz zu reduzieren.

Bei der Kartoffel wie auch bei anderen Organismen wurde die erste Kopplungskarte mit RFLP-Markern (Botstein *et al.*, 1980) erstellt (Bonierbale *et al.*, 1988). Weitere folgten mit RFLP-, AFLP-, SSR- und anderen PCR-gestützten Markern (Gebhardt *et al.*, 1989, 1991, 2001; Tanksley *et al.*, 1992; Jacobs *et al.*, 1995; Milbourne *et al.*, 1998; Van Eck *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2001). Durch die rasante Entwicklung neuer Methoden stehen nunmehr molekulare allelische Variationen, insbesondere SNPs (*single nucleotide polymorphisms*), direkt als Marker zur Verfügung (siehe Kap. 1.5.).

Die Konstruktion von Kopplungskarten durch die Verwendung von DNA-Markern bildet die notwendige Voraussetzung für die Lokalisation sowohl von quantitativen, als auch von qualitativen Loci. Das Kartieren von QTLs ist allerdings ungenauer als das von MTLs, da individuelle Rekombinanten zwischen einem QTL und einem gekoppelten Marker nicht identifiziert werden können. Der mit einem Marker festzustellende QTL-Effekt nimmt mit der physikalischen Entfernung des Markers von dem QTL ab. Dabei hängt das ‚Ausstrahlen‘ eines QTLs von dessen Einfluss auf das untersuchte Merkmal ab. Ein QTL-Gen mit einem starken QTL-Effekt ist auch noch durch einen relativ weit entfernten Marker festzustellen, wohingegen ein Locus mit geringem Effekt nur mit sehr eng gekoppelten Markern identifiziert werden kann.

### 1.4.2. Aufbau von QTL-Analysen

Zur Untersuchung von QTLs stellen sich zwei prinzipielle Fragen: (1) Welche Individuen sollen untersucht werden und (2) welche Loci bzw. Marker werden dazu genutzt.

**Wahl der Untersuchungsgruppe: Assoziations- versus Kopplungsstudien.** In der Humangenetik haben sich zur Analyse von komplexen Merkmalen Assoziationsstudien (*association studies*) bewährt, bei denen Genotypisierungsdaten in *cases* und *controls* erhoben werden (Lander und Schork, 1994; Templeton, 1995). Hierbei handelt es sich um aus der gesamten verfügbaren Population ausgewählte Individuen, die bezüglich des untersuchten Merkmals die extremsten Merkmalsausbildungen aufweisen bzw. bei der Analysen von Krankheiten entsprechend krank (*cases*) oder gesund (*controls*) sind. Befindet

sich ein Marker in einem Zielgen oder in dessen physikalischer Nähe, so ist ein *linkage disequilibrium* festzustellen und der Marker korreliert mit dem Merkmal. Im Gegensatz zu Assoziationsstudien werden in Kopplungsstudien (*linkage studies*) benötigten Datensätze - Genotypisierungsergebnisse und phänotypische Evaluierungen - in Familien erhoben und miteinander korreliert.

In der Pflanzengenetik sind Assoziationsstudien auf Basis von *cases* und *controls* bisher die Ausnahme (Thornsberry *et al.*, 2001; Gebhardt unveröffentlichte Daten). Durch die Möglichkeit von Kreuzungsexperimenten werden zur Untersuchung von quantitativen Merkmalen üblicherweise Kopplungsstudien mit Kreuzungspopulationen, welche bezüglich des Zielmerkmals segregieren, durchgeführt. Als Kreuzungspopulationen können rekombinante Inzuchtlinien (RIs), F1-, F2-, F3- oder Rückkreuzungspflanzen verwendet werden.

**Auswahl von Loci bzw. Markern: Genomweite Analysen versus *candidate gene approach*.** Entsprechend dem genetischen Charakter quantitativer Merkmale wird ein QTL-Effekt von mehreren Genen bewirkt, die über das gesamte Genom verteilt sein können (siehe Kap. 1.3.). Somit sollten für eine optimale QTL-Analyse Marker ausgewählt werden, mit denen mit möglichst engem Abstand das gesamte Genom abgedeckt ist. Diesem Anspruch kann in der Praxis allerdings (bisher) nicht zufriedenstellend entsprochen werden, da in der Regel nicht genügend Marker für eine entsprechend hochauflösende Abdeckung vorhanden sind und für das komplette Genom zu viele Marker notwendig sind. Beispielsweise werden für eine genomweite Kopplungs-/Assoziationsstudie beim Menschen 30 000 (Collins *et al.*, 1999) bis zu einer Million Marker (Roberts, 2000) als erforderlich diskutiert. Somit besteht also die Notwendigkeit einer Vorauswahl.

Hierbei hat sich zur Identifizierung sowohl von MTLs als auch von QTLs der *candidate gene approach* als nützlicher Ansatz erwiesen (Bryne und McMullen, 1996; Pflieger *et al.*, 2001). Bei dieser Methode werden Marker betrachtet, die in Kandidatengenen (CGs) für das betreffende Merkmal liegen. Obwohl es in der Literatur leicht unterschiedliche Definitionen für Kandidatengene gibt (Pflieger *et al.*, 2001), werden im Folgenden solche Gene als CGs eingestuft, die (1) in Regionen mit bereits bekannten QTL-Effekten bezüglich des Merkmals kartieren und/oder (2) aufgrund ihrer Funktion theoretisch an der Ausbildung des Merkmals beteiligt sein könnten. Bei der Untersuchung von Resistenzen gelten somit grundsätzlich RGL-Sequenzen (*resistance gene like*) aufgrund ihrer Homologie zu bereits charakterisierten Resistenzgenen (siehe Kap. 1.3.1.) als Kandidatengene. Zur Identifizierung eines QTLs ist es allerdings nicht unbedingt erforderlich, dass der untersuchte Marker in dem Gen liegt, welches das Merkmal beeinflusst; auch ein physikalisch eng gekoppelter Marker zeigt den QTL-Effekt an (Johnson und Todd, 2000; Rich, 2000; siehe auch Kap. 1.4.1.).

Auf Basis der beschriebenen Kriterien werden nun bei einer QTL-Analyse die Genotypisierungsdaten (Kap. 1.5.) von sinnvoll ausgewählten Markern und phänotypische Werte in einer geeigneten Population erhoben, die beiden Datensätze korreliert und statistisch ausgewertet. Somit können letztlich Aussagen getroffen werden, ob ein Marker mit dem untersuchten Merkmal assoziiert/gekoppelt ist.

## 1.5. Genotypisieren von Polymorphismen

### 1.5.1. Methoden zum Genotypisieren

Wie in Kapitel 1.4. beschrieben, sind für QTL-Analysen neben phänotypischen Werten Genotypisierungsdaten erforderlich. Zu diesem Zweck wurden in der Pflanzengenetik bisher vor allem RFLP- (*restriction fragment length polymorphism*), AFLP- (*amplified fragment length polymorphism*), RAPD- (*random amplified polymorphic DNA*), SSCP- (*single strand conformation polymorphism*), CAPS- (*cleaved amplified polymorphic sequence*), SSR- (*single sequence repeats*) und andere PCR-basierte Marker genutzt (Kap. 1.4.1.). Für diese Methoden sind Informationen über die direkte genetische Ursache der allelischen Variationen nicht erforderlich.

Die molekulare Grundlage aller DNA-Marker sind Insertionen, Deletionen, Duplikationen, Translokationen, Inversionen oder Punktmutationen/SNPs (*single nucleotide polymorphisms*). Von allen Polymorphismen<sup>1</sup> sind SNPs - Basenvariationen an einzelnen Sequenzpositionen - die häufigsten genetischen Variationen; beispielsweise stellen sie im menschlichen Genom mit einer Frequenz von 1 SNP pro 1000 bp (Wang *et al.*, 1998) etwa 90% aller allelischen Unterschiede (Collins *et al.*, 1998). Wegen der großen Bedeutung der SNPs für die biomedizinische Forschung wurde 1999 die nicht-kommerzielle Organisation *The SNP Consortium LTP* (<http://snp.cshl.org>) eingerichtet, in deren öffentlichen Datenbank mittlerweile über 1,5 Millionen SNPs des Humangenoms dokumentiert sind.

In der letzten Jahren wurde aufgrund von technischen und methodischen Entwicklungen diese Quelle der genetischen Variationen direkt dem Genotypisieren zugänglich (*Reviews*: Ellis, 2000; Kwok, 2000, 2001; Gut, 2001; Shi, 2001; Syvänen, 2001). Seit dem ersten umfangreichen Einsatz von SNPs als Marker (Wang *et al.*, 1998) haben sie sich zu vielgenutzten Markern für Kartierungs-, Kopplungs- und Assoziationsstudien entwickelt. Im Gegensatz zu den oben angeführten ‚sequenzunspezifischen‘ Methoden, werden bei den im Folgenden vorgestellten Ansätzen die Genotypisierungstests jeweils spezifisch zur Diskriminierung bekannter allelischer Sequenzen entworfen. Üblicherweise erfolgt die initiale

---

<sup>1</sup> Per Definition spricht man von einem Polymorphismus, wenn das seltenere Allel in der Population mit wenigstens 1% vertreten ist, ansonsten wird die Variation als Mutation eingestuft (Schafer und Hawkins, 1998).

Detektion von SNPs und anderen Polymorphismen durch vergleichendes Sequenzieren homologer Fragmente in verschiedenen Genotypen. Zum Genotypisieren identifizierter SNPs steht dann eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung. Eine Kategorisierung der verschiedenen Techniken ist schwierig und wird kontrovers diskutiert (Ellis, 2000; Kwok, 2000, 2001; Gut, 2001; Shi, 2001; Syvänen, 2001). Allerdings können in der Regel alle Ansätze in zwei Elemente zerlegt werden:

(1) Zunächst ist eine spezifische Wechselwirkung mit den Allelen des SNPs erforderlich. Diese allelspezifische Diskriminierung kann durch (a) Hybridisierung, (b) Ligation eines Oligonukleotides, (c) enzymatisches Erkennen und Schneiden oder (d) Extension eines Primers erfolgen.

(2) Der allelspezifischen Interaktion folgt die Analyse der allelspezifischen Produkte. Die Produkte werden unterschieden durch (a) die Analyse der Masse oder (b) der Struktur/Länge, oder durch (c) die Detektion eines elektrischen oder (d) eines Licht-Signals, welches bei der allelspezifischen Produktbildung entsteht. Insbesondere die Wahl der Detektion beeinflusst das ‚Format‘ der Analyse. So werden zur Separation u. a. Gele, Massenspektrometer, HPLC-Instrumente oder Auslesegeräte für Mikrotiterplatte bzw. *Macro-* oder *Microarrays* eingesetzt.

Zum Genotypisieren werden fast alle Kombinationsmöglichkeiten mit jeweils einer Technik aus den beiden Schritten genutzt. Neben den im Rahmen dieser Arbeit genutzten Methoden, welche unten ausführlicher vorgestellt werden, werden insbesondere folgende Ansätze vielfach diskutiert: Ligation von Oligonukleotiden (Landegren *et al.*, 1988; Nickerson *et al.*, 1990), TaqMan<sup>®</sup> (Livak *et al.*, 1995, 1999), *Molecular Beacons* (Tyagi *et al.*, 1998), Invader<sup>®</sup> (Griffin *et al.*, 1999) und *serial invasive signal amplification reaction* (Hall *et al.*, 2000). Bisher hat sich allerdings keine der Genotypisierungsmethoden allgemein durchgesetzt (z.B. Kwok, 2001).

#### **1.5.1.1. *BigDye-Sequencing***

Die *BigDye-Sequencing*, welche der konventionellen Sequenzierung nach Sanger entspricht, wird primär zur initialen Identifizierung von Polymorphismen genutzt, kann allerdings auch zur Genotypisierung eingesetzt werden. Die hinlänglich bekannte Methode nutzt im ersten Schritt die Extension eines Primers, gefolgt vom Kettenabbruch durch Einbau eines Didesoxy-Nukleotids. Anschließend werden die Produkte aufgrund der Länge unter Verwendung von Fluoreszenzdetektion aufgetrennt.

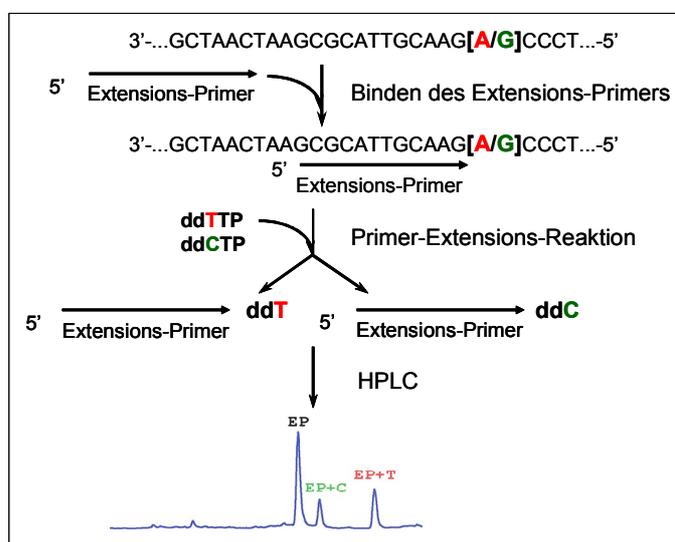
#### **1.5.1.2. PCR-basierte Genotypisierungsmethoden**

Die allelspezifische PCR wird schon lange zum Genotypisieren genutzt (Bottema *et al.*, 1993, Newton *et al.*, 1989). Hierbei wird für die allelische Wechselwirkung das Prinzip der

Primer-Extension genutzt. Die Spezifität erfolgt allerdings darüber, ob der Primer, abhängig vom vorliegenden Allel, korrekt bindet und es dementsprechend zur Amplifikation kommt oder nicht. Bei DFLP- (*DNA fragment length polymorphism*) Analysen (Schneider *et al.*, 1999) erfolgt für alle Allele eine Amplifikation, allerdings unterscheiden sich die allelischen PCR-Produkte in ihrer Länge, da mit der PCR eine allelische Deletion/Insertion amplifiziert wird. Die Produkte dieser PCR-basierten Wechselwirkungen mit den Allelen werden in der Regel mit einfachen Agarosegelen analysiert, allerdings werden auch neue Ansätze zur Diskriminierung diskutiert (Germer und Higuchi, 1999; Germer *et al.*, 2000).

### 1.5.1.3. *Minisequencing*

Die allelspezifische Wechselwirkung erfolgt bei allen *Minisequencing*-Ansätzen durch Extension eines Primers um eine Base (*single nucleotide primer extension* = SNuPE).



**Abb. 1-4: Prinzip des *Minisequencings*.** Im ersten Schritt findet eine Verlängerung des Extensions-Primers entsprechend dem vorliegenden Genotyp um ein passendes Didesoxy-Nukleotid statt (SNUPE). Anschließend folgt die analytische Separation der Extensions-Produkte. Hier ist die Auftrennung eines heterozygoten Individuums mittels HTLC gezeigt.

Hierbei bindet zunächst der Extensions-Primer direkt vor dem SNP. Während der Primer-Extensions-Reaktion wird der Extensions-Primer entsprechend dem Genotyp um das passende Didesoxy-Nukleotide verlängert, danach bricht die Extension ab (Abb. 1-4).

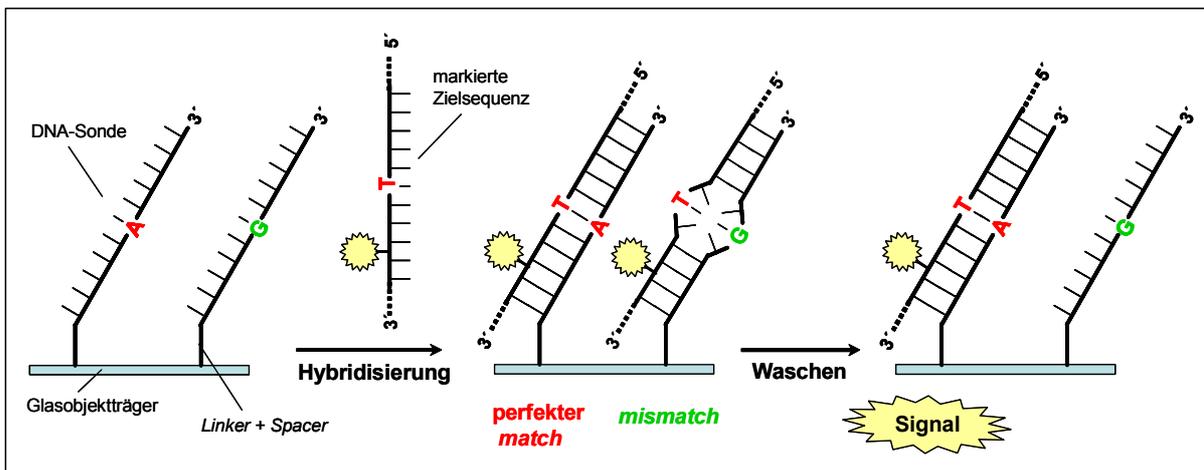
Die Primer-Extension kann mit mehreren analytischen Methoden zur Auftrennung der allelspezifischen Produkte kombiniert werden. So werden die Produkte aus den SNUPE-Reaktionen, abhängig von der Wahl der Detektionsmethode,

analysiert mit Gele (SNapShot™, [www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com)), Massenspektrometern (Little *et al.*, 1997; Haff und Smirnov, 1997; Ross *et al.*, 1998; Sauer *et al.*, 2000), Auslesegeräte für Mikrotiterplatte (Syvänen *et al.*, 1994; Chen und Kwok., 1997), *Microarrays* (Shumaker *et al.*, 1996; Pastinen *et al.*, 1997) oder HPLC-Instrumenten (Hoogendorn *et al.*, 1999, 2000; Giordano *et al.*, 2001).

### 1.5.1.4. Allelspezifische Hybridisierung auf DNA-Chips

Bei diesem Ansatz erfolgt die allelspezifische Wechselwirkung durch Hybridisierung. Die Detektion beruht auf einem Fluoreszenzsignal, und *Microarrays*/DNA-Chips bilden die

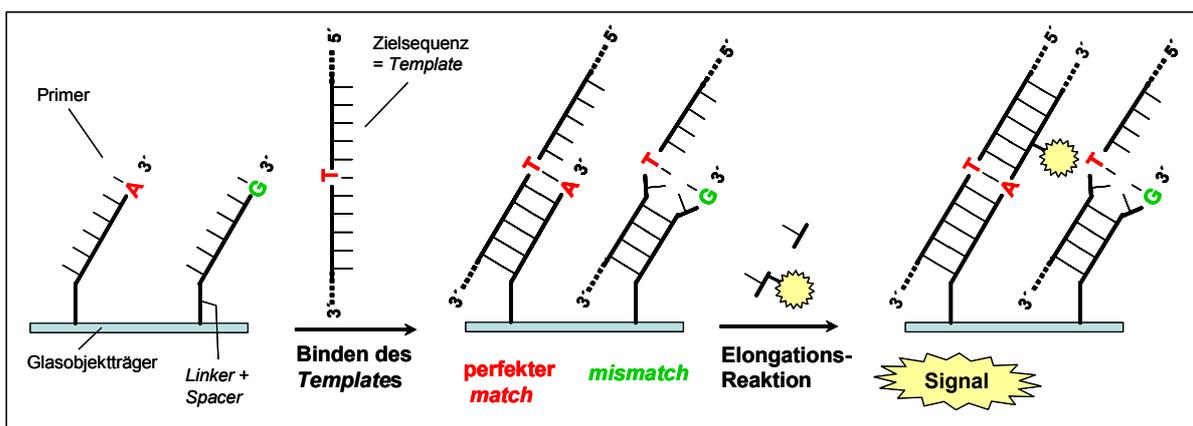
Plattform (Wang *et al.*, 1998; Cho *et al.*, 1999; Benters *et al.*, 2002). Die allelischen Oligonukleotidsonden sind über *Linker* mit dem 5'-Ende an definierten Positionen auf dem Glasobjektträger immobilisiert. Da der Chip mit fluoreszenzmarkierter Zielsequenz hybridisiert wird und diese nur bei perfekter Bindung an der passenden DNA-Sonde verbleibt, ist eine Genotypisierung über die Position des Fluoreszenzsignals auf dem Chip möglich.



**Abb. 1-5: Schematische Darstellung der allelspezifischen Hybridisierung auf DNA-Chips.** An die Oberfläche des Glasobjektträgers sind über *Linker* die alternativen DNA-Sonden, welche mit Abstandhaltern (*Spacer*) versehen sind, kovalent mit dem 5'-Ende gebunden. Mit amplifizierter Zielsequenz, welche mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist, wird der DNA-Chip hybridisiert. Abhängig von der Sequenz bindet die Zielsequenz perfekt oder es bildet sich ein *mismatch*. Nur die perfekt gebundene DNA wird nicht abgewaschen und mit einem Fluoreszenzlesegerät kann ein Signal an dieser Position auf dem Chip detektiert werden.

### 1.5.1.5. Primer-Elongation auf DNA-Chips

Diese Genotypisierungsmethode (Erdogan *et al.*, 2001; Huber *et al.*, 2001) bedient sich ebenfalls zur allelischen Diskriminierung der spezifischen Extension von Primern (Abb. 1-6).

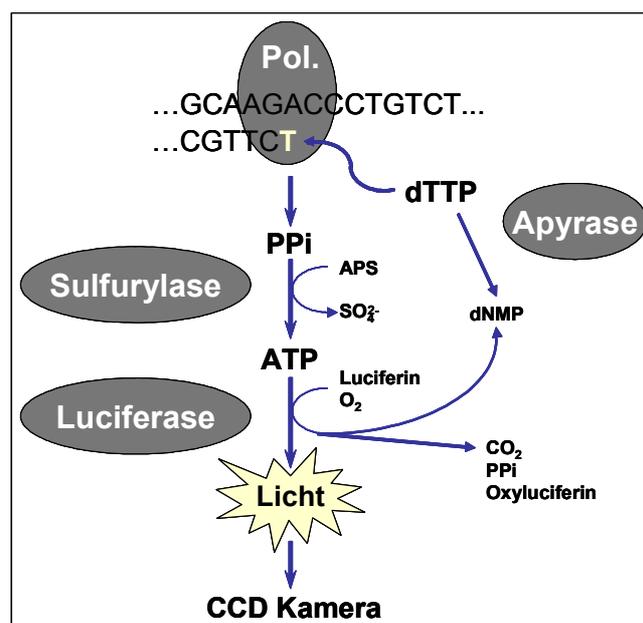


**Abb. 1-6: Schematische Darstellung der allelspezifischen Primer-Elongation auf DNA-Chips.** Auf der Oberfläche des Glasobjektträgers sind Primer über *Linker* und *Spacer* mit dem 5'-Ende immobilisiert. Am 3'-Ende unterscheiden sich die alternativen Primer entsprechend des zu genotypisierenden SNPs. Die amplifizierte Zielsequenz bindet an die Primer. Abhängig von dem Allel der Zielsequenz bindet das 3'-Ende der Primers oder nicht. Bei einer perfekten Bindung kommt es bei der anschließenden Elongationsreaktion, welche durch eine *Taq*-Polymerase katalysiert wird, zu einer allelspezifischen Verlängerung des passenden Primers. Da während der Elongation fluoreszierende Nucleotide eingebaut werden, kann mit einem Fluoreszenzlesegerät das positive Signal Position auf dem Chip detektiert werden.

Wie bei der allelspezifischen PCR (Kap. 1.5.1.2.) kommt es nur dann zur Polymerase-katalysierten Verlängerung des Primers, wenn die amplifizierte Zielsequenz, welche als Template dient, perfekt an den Primer bindet; bei dem alternativen Primer mit dem nicht passenden allelischen 3'-Ende bildet sich ein *mismatch* und die Elongationsreaktion findet nicht statt. Da bei der Elongationsreaktion fluoreszenzmarkierte Nukleotide eingebaut werden, kann die Signaldetektion mit einem Fluoreszenzlesegerät erfolgen, und die Genotypzuordnung ist über die Position des Signals auf dem Chip möglich.

### 1.5.1.6. Pyrosequencing

Auch bei dieser Methode beruht die allelspezifische Diskriminierung auf der Extension eines Primers, zur Analyse der Produkte werden Lichtsignale detektiert (Lumineszenz). *Pyrosequencing* (Ronaghi *et al.*, 1996, 1998; Review: Ronaghi, 2001) ist eine relativ neue Methode, welche sowohl zur Sequenzierung kurzer DNA-Abschnitte (bis 100bp) (Ronaghi, 1998) als auch zum Genotypisieren von SNPs (Ahmadian *et al.*, 2000; Alderborn *et al.*, 2000; Nordström *et al.*, 2000) geeignet ist. *Pyrosequencing* nutzt eine Kaskade



**Abb. 1-7: Schematische Darstellung der enzymatischen Reaktionen während des Pyrosequencings.** In einer enzymatischen Kaskade wird ein sichtbares Lichtsignal erzeugt, welches direkt proportional zu der Anzahl der eingebauten Nukleotide ist.

enzymatischer Reaktionen zum direkten Verfolgen der DNA-Synthese (Abb. 1-7). Die Kaskade wird gestartet, indem ein Nukleotid durch DNA-Polymerase katalysiert passend zum *Template* eingebaut und somit anorganisches Pyrophosphat (PPi) freigesetzt wird. Das Pyrophosphat wiederum wird durch Sulfurylase in ATP umgesetzt. Dieses dient schließlich zusammen mit Luciferin als Substrat für das Enzym Luciferase, in einer Redox-Reaktion entsteht unter Lichterzeugung Oxyluciferin. Das freigesetzte Lichtsignal ist proportional zur Anzahl der eingebauten Nukleotide und wird mit einer DDC-Kamera

(*charged coupled device*) quantitativ gemessen. Um nun den Einbau der verschiedenen Nukleotide unterscheiden zu können, werden die vier unterschiedliche Nukleotide jeweils getrennt zugegeben und die nicht eingebauten Nukleotide anschließend vor der Injektion eines neuen Nukleotids durch Apyrase abgebaut. Da im Verlauf der Kaskade ATP entsteht, wird zur DNA-Synthese das ATP-Derivat  $\alpha$ ATP verwendet.

## 1.5.2. Genotypisieren von Polymorphismen in polyploiden Organismen

Trotz der rasanten Entwicklungen bei den Methoden zum Genotypisieren von Polymorphismen (Kap. 1.5.1.) und den damit verbundenen Vorteilen bei den auf Genotypisierungsdaten angewiesenen Untersuchungen (Kap. 1.4.) fehlen bisher dokumentierte Arbeiten, in denen SNP-Genotypisierung bei polyploiden Organismen durchgeführt worden sind. Und das, obwohl viele agronomisch wichtige Nutzpflanzen, wie die Kartoffel, polyploid sind (Kap. 1.1.).

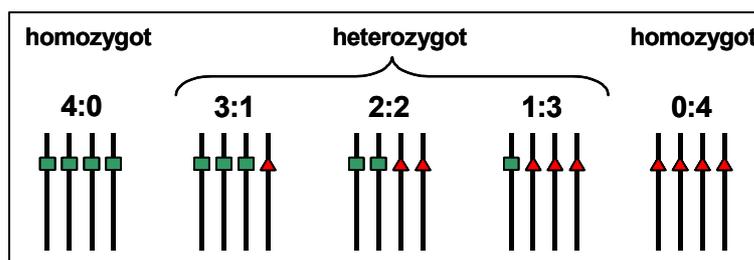


Abb. 1-8: Mögliche allelische Verteilungen eines binären Polymorphismus in einem tetraploiden Organismus.

Im Gegensatz zu diploiden Genomen, kann das Verhältnis von Allelen in einem polyploiden Individuum stärker variieren. Betrachtet man einen einzelnen binären Polymorphismus (mit den

Allelen A und B), so kann dieser bei einem diploiden Genotypen in drei Zuständen auftreten: AA, AB und BB. Bei polyploiden Organismen sind neben den beiden homozygoten Allelzuständen allerdings noch mehrere heterozygote Kombinationen möglich; bei einer tetraploiden Art sind insgesamt fünf Allelzustände AAAA und BBBB, sowie AAAB, AABB und ABBB (siehe auch Abb. 1-8), bei Hexaploiden sieben und bei Octaploiden sogar neun verschiedene Allelkombinationen zu unterscheiden. Somit sollte also eine Methode zum Genotypisieren von Polymorphismen in polyploiden Organismen quantitativ sein, um zwischen diesen Allelverhältnissen differenzieren zu können.

## 1.6. Ziele und Strategien dieser Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit stand die Entwicklung eines neuen, auf SNPs basierenden Markersystems zur Analyse von Pathogenresistenzen bei der Kartoffel im Vordergrund. Mit diesem System sollte dann die quantitative Resistenz gegen *P. infestans* untersucht werden. Wie der Abbildung 1-9 zu entnehmen ist, waren hierfür mehrere aufeinander aufbauende Arbeitsschritte zu absolvieren, so dass zusammenfassend das Projekt auf die Untersuchung folgender Kernbereiche fokussiert war:

1. Identifizierung und Analyse von SNPs und Indels in Pathogenresistenz-vermittelnden Regionen

2. Evaluierung und Optimierung von Methoden zum quantitativen Genotypisieren von SNPs in polyploiden Organismen
3. QTL-Analyse mit SNPs von quantitativer Resistenz gegen *P. infestans*.

### 1.6.1. Identifizierung und Analyse von SNPs in RGL-Kandidatenregionen<sup>2</sup>

Wie in Kapitel 1.4. dargelegt, werden bei QTL-Analysen phänotypische Daten mit Genotypisierungsdaten korreliert. Somit war es also zunächst notwendig, Polymorphismen – die Grundlage aller Marker und auch aller genetisch bedingter individueller Unterschiede – zu identifizieren. Aufgrund der Vorteile von SNPs als Marker (siehe Kap. 1.5.1.) sollte die Identifizierung auf diese genetischen Variationen konzentriert sein. Hierfür wurden folgende Arbeitsschritte durchgeführt:

**Identifizierung von RGL-Kandidatenregionen.** In der ersten Phase galt es, Regionen zu identifizieren, in welchen nach SNPs gesucht werden sollte. Die hierfür gewählte Strategie ist dem Prinzip des *candidate gene approach* (siehe Kap. 1.4.2.) entlehnt. Die Hypothese aufgreifend, dass quantitative Resistenzgene, zumindest strukturell, *R*-Genen entsprechen (siehe Kap. 1.3.), wurden Sequenzhomologe von bekannten *R*-Genen (RGLs) als Kandidatengene für die quantitative Resistenz eingestuft. Zum Detektieren solcher Kandidatengene sollte eine genomische BAC-Bibliothek mit RGL-Sonden durchmustert werden (Tab. 2-1). Die dabei eingesetzten Sonden gehen teilweise auf eine Untersuchung von Leister *et al.* (1996) zurück. Anhand eines *Alignments* bekannter NBS-LRR-Resistenzgene hatten Leister *et al.* (1996) degenerierte Primer zu konservierten Bereichen der NBS-kodierenden Region entworfen und RGLs aus dem Kartoffelgenom amplifiziert. Diese heterogenen, nicht Locus-spezifischen RGL-PCR-Produkte kartierten teilweise in Regionen mit bereits beschriebenen QTL-Effekten gegen *P. infestans* (siehe Abb. 1-3); und somit galten diese Sonden (*St.1.2.1*, *St.1.2.4*, *St.3.3.13*) als besonders geeignet zur Identifizierung von aussichtsreichen Kandidatenregionen. Als weitere Sonden sollten RGL-Sequenzen eingesetzt werden, welche bei der Untersuchung der *hot spot* Region für Resistenzen auf Chromosom V identifiziert worden waren (siehe Kap. 1.3.; Ballvora *et al.*, 2002), und deren Verwendung zum Auffinden von Regionen mit homologen Resistenzgenen führen sollte. Da für QTL-Analysen Kartierungsinformationen der verwendeten Marker notwendig sind, sollten die durch diese *Screenings* isolierten BAC-Klone kartiert werden.

**Identifizierung von SNPs in RGL-Kandidatenregionen.** Nach der Identifizierung von Kandidatenloci mussten in diesen allelische Variationen detektiert werden. Da Marker für QTL-Analysen nicht notwendigerweise in den Kandidatengenomen selber liegen müssen, sondern ebenso in deren physikalischer Nähe informativ sind, wurde zur Identifizierung von SNPs in RGL-Kandidatenregionen folgende Strategie gewählt: Die BAC-Enden wurden ansequenziert und auf der Basis der erhaltenen Sequenzinformationen wurden spezifische Primer entworfen, mit welchen dann die jeweils homologen Fragmente in einem Genpool von 17 tetraploiden und 11 diploiden Kartoffellinien (u. a. Eltern der Kreuzungspopulationen für die QTL-Analyse, alle Genotypen in Kap. 2.5.1. beschrieben) amplifiziert und vergleichend sequenziert werden sollten.

Die so generierten SNP-Daten von RGL-Regionen sollten als Grundlage für die QTL-Analyse dienen, Einsichten in die Variabilität des Kartoffelgenoms liefern und aufgrund der generellen Nutzbarkeit in einer Datenbank präsentiert werden.

### **1.6.2. Evaluierung und Optimierung von Methoden zum quantitativen Genotypisieren von SNPs in polyploiden Organismen**

Da die QTL-Analyse mit tetraploidem Pflanzenmaterial durchgeführt werden sollte, und bisher dokumentierte Arbeiten zum quantitativen Genotypisieren in polyploiden Organismen fehlten, sollten diverse Methoden getestet und optimiert werden, mit dem Ziel der exakten, quantitativen Genotypisierung.

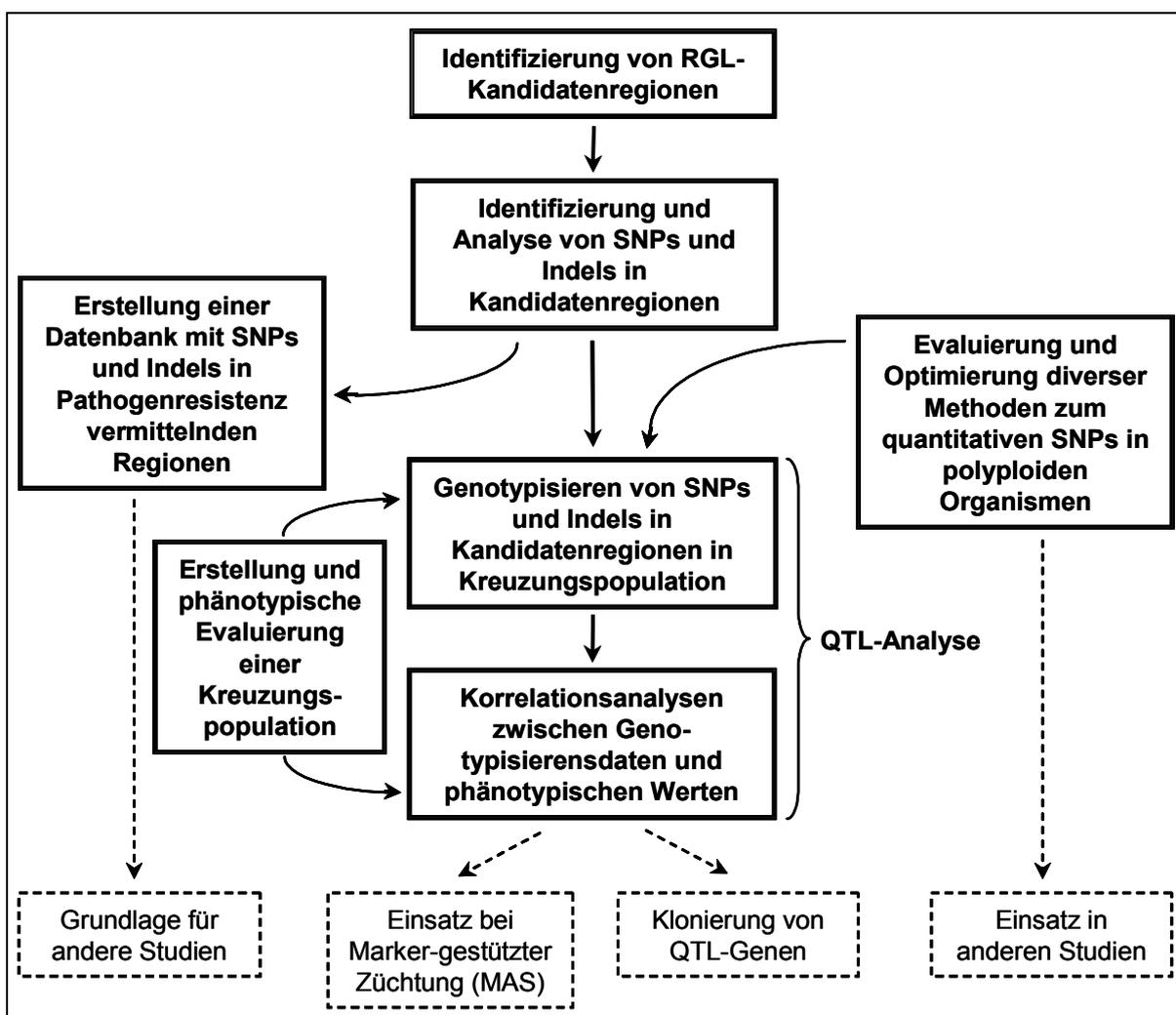
### **1.6.3. QTL-Analyse zur quantitativen Resistenz gegen *P. infestans***

Entsprechend der allgemeinen Vorgehensweise bei QTL-Analysen (Kap. 1.4.) mussten sowohl phänotypischen Daten als auch Genotypisierungsdaten in einer Untersuchungspopulation erhoben werden. Als Untersuchungspopulationen dienten tetraploide F1-Hybrid-Populationen aus Kreuzungen zwischen je einem anfälligen und einem quantitativ resistenten Elter, welche im Rahmen einer Kooperation freundlicherweise von der Firma Saka-Ragis zur Verfügung gestellt wurden. Das Pflanzenmaterial wurde mehrfach phänotypisch bezüglich der Merkmale der quantitativen Resistenz gegen *P. infestans* und dem Reifeverhalten evaluiert (Kap. 1.3.). Die benötigten Genotypisierungsdaten sollten aufbauend auf den zuvor erhaltenen Teilergebnissen der Arbeit erhoben werden. Dazu sollten Polymorphismen in Kandidatenregionen (Kap. 1.6.1.)

---

<sup>2</sup> Da es sich bei untersuchten Sequenzen nicht unbedingt um RGL-Sequenzen handelt, sondern um Regionen, die mit solchen Kandidatengenomen physikalisch eng gekoppelt sind, wird im Folgenden von RGL-Kandidatenregionen die Rede sein.

mit Hilfe von geeigneten Methoden unter Berücksichtigung der exakten Allelverhältnisse (Kap. 1.6.2.) genotypisiert wurden. Diese genetischen Daten sollten in ausgewählten *cases* und *controls*, also den Individuen mit den extremsten Merkmalsausprägungen bezüglich der Resistenz (siehe auch Kap. 1.4.2.), und teilweise in allen F1-Nachkommen der Kreuzungen untersucht werden. Schließlich sollten durch Korrelationsanalysen mit den phänotypischen und genetischen Daten Erkenntnisse darüber gewonnen werden, welche Loci und mit welchem jeweiligen Einfluss an der Ausbildung der quantitativen Resistenz gegen *P. infestans* in den tetraploiden Populationen beteiligt sind.



**Abb. 1-9: Zusammenfassung der wichtigsten Arbeitsschritte dieser Arbeit.** In der ersten Phase wurden Regionen detektiert, welche allgemein als Kandidatenregionen für das Merkmal Resistenz eingestuft werden können. Anschließend wurden in diesen Kandidatenregionen allelische Variationen identifiziert. Diese Ergebnisse wurden zum einem in einer neu eingerichteten Datenbank analysiert und öffentlich präsentiert, und zum anderen dienten sie als Ausgangsbasis für eine QTL-Analyse. Bei dieser Analyse wurden auch Erkenntnisse über Methoden zum quantitativen Genotypisieren in polyploiden Organismen genutzt. Somit konnten schließlich in der Analyse zur quantitativen Resistenz gegen *P. infestans* phänotypische Evaluierungswerte von Kreuzungspopulationen mit genetischen Daten dieser Populationen korreliert werden und letztlich Loci mit positivem Einfluss auf das Zielmerkmal identifiziert werden. Mögliche weiterführende Projekte, welche auf diesen Ergebnissen aufbauen, sind in gestrichelten Boxen eingefügt.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Chemikalien, Enzyme und Oligonukleotide

Die verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel des Reinheitsgrades p.A. wurden, soweit nicht anders vermerkt, von folgenden Firmen bezogen: Biozym (Hessisch Oldendorf), Sigma-Aldrich (Deisendorf), Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Difco (Detroit, USA), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), DUCHEFA (Haarlem, Niederlande), BIOMOL (Hamburg).

Enzyme wurden von Invitrogen-Life Technologies/GIBCO (Karlsruhe; Carlsbad, CA, USA), Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg; Piscataway, NJ, USA), Applied Biosystems (Weiterstadt; Foster City, CA, USA), New England Biolabs (Frankfurt a.M.), Biozym (Hessisch Oldendorf), MBI-Fermentas (St. Leon-Rot), Clontech (Palo Alto, CA, USA) und Roche (Mannheim) bezogen.

dNTPs und ddNTPs wurden von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg; Piscataway, NJ, USA) und Radioisotope [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-dCTP wurden von Amersham-Buchler (Braunschweig) geliefert. Es wurden Röntgenfilme von Kodak (Rochester, USA) und *Dynabeads* von Dynal ASA (Oslo, Norwegen) genutzt.

Für die Erstellung von *Microarrays* wurden Glasobjektträger und Kopplungslösungen von Quantifoil (Jena) bezogen.

Des Weiteren wurden *Kits* von Qiagen (Hilden), Molecular Probes (Eugene, Oregon, USA) und Pyrosequencing AB (Uppsala, Schweden) verwendet.

Oligonukleotide wurden bei MWG-Biotech (München), Metabion (Martinsried) und Invitrogen-Life Technologies (Carlsbad, CA, USA) bestellt.

### 2.2. Medien und Lösungen

LB-Medium	10 g/l Trypton 10g/l NaCl 5g/l Hefeextrakt pH 7,5 (NaOH) bei festen Medien: 15 g/l Agar	10 x Southern- Waschpuffer	50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 1 mM EDTA 2% SDS pH 7,0 (NaOH)
LB <sub>Tet</sub> -Medium	LB-Medium mit 12,5 $\mu\text{g/ml}$ Tetracyclin	YEB-Medium	1 g/l Bacto-Hefeextrakt 5 g/l Bacto-Trypton 5 g/l Saccharose 5 g/l Fleischextrakt 2 mM $\text{MgSO}_2$ pH 7,0 (NaOH) bei festen Medien: 15 g/l Agar
TAE	40 mM Tris-Acetat 1 mM EDTA pH 8,0		
TBS	137 mM NaCl 20 mM Tris pH 7,8 (HCl)	10 x SSC	3 M NaCl $\text{Na}_3\text{-Citrat} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ pH 7,0 (HCl)

PBS	140 mM NaCl 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O 2,7 mM KCl 1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Hybrisisierungs- puffer	7% SDS 0,12 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1 mM EDTA pH 7,0 (NaOH)
TE	10 mM Tris · HCl 1 mM EDTA pH 8,0	2 x SSPE Wasch- puffer	2 x SSPE 0,1% SDS
20 x SSPE	3 M NaCl 200 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 20 mM EDTA pH 7,0 (NaOH)	Denaturierungs- puffer	1,5 M NaCl 0,5 M NaOH
		Neutralisierungs- puffer	1,5 M NaCl 0,5 M Tris-HCl pH 7,5

## 2.3. Molekularbiologische Standardmethoden

**Allgemein.** Molekularbiologische Standardmethoden wurden, soweit nicht anders vermerkt, nach Sambrook *et al.* (1989) und Sambrook und Russel (2000) durchgeführt.

### 2.3.1. Isolierung von genomischer DNA und von Plasmid-DNA

**Isolierung von genomischer DNA.** Für die Präparation von genomischer Pflanzen-DNA wurden 0.3 – 0.4 g gefriergetrocknetes Blattmaterial gemörsert und in 20 ml Lysepuffer (100 mM Tris-HCl, pH 9,5, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 2% (w/v) CTAB, 1% (w/v) Polyethylenglycol 6000 und 0.25% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol) aufgenommen und 20 min bei 75°C inkubiert. Die Suspension wurde mit 1 vol Chloroform/Isoamylalkohol (24:1 v/v) gemischt. Nach der Phasentrennung wurde die wässrige Phase mit 1 M HCl auf pH 7.0 titriert und mit 400  $\mu$ g/ml DNase-freier RNase behandelt. Abschließend wurde die DNA mit Qiagen Tip 100 Säulen (Qiagen, Hilden) unter Befolgung des Herstellerprotokolls aufgereinigt und eluiert.

**Manuelle Isolierung von BAC-DNA.** Die manuelle Präparation von BAC-DNA erfolgte mit dem *Plasmid Midi Kit* von Qiagen (Hilden). Dabei wurde bis auf folgende Modifikationen das Herstellerprotokoll befolgt: Es wurde eine 100 ml über-Nacht-Kultur für die DNA Präparation angesetzt. Das Bakterienpellet wurde mit 15 ml P1-, P2- und P3-Puffer resuspendiert, lysiert und neutralisiert. Ausgefällte Komponenten wurden abzentrifugiert und der Überstand direkt, ohne Isopropanol-Fällung, über *QIAfilter Midi Cartridges* (Qiagen, Hilden) gefiltert und auf *Qiagen-Tip-100* Säulen aufgetragen. Abschließend wurde das DNA-Pellet in 50  $\mu$ l EB Puffer resuspendiert.

**Automatisierte Isolierung von BAC-DNA.** Für die automatisierte Präparation von BAC-DNA mit einer Ausbeute von bis zu 500 ng wurde der Pipettierroboter BioRobot™ 9600 (Qiagen, Hilden) genutzt. Dabei wurden die Herstellerangaben des verwendeten *R.E.A.L. Prep BioRobot Kits* (Qiagen) genau befolgt.

### 2.3.2. Konzentrationsbestimmung von DNA

Üblicherweise wurde die Qualität und Quantität von DNA gemessen, indem auf einem Agarosegel die Bandenintensität mit einer Molekularen-Massen-Leiter (Gibco-BRL, Karlsruhe) verglichen wurden. Alternativ wurde die Absorption bei  $\lambda = 260 \text{ nm}$  mit einem UV-Spektrometer (Smart Spec 3000, Bio-Rad, München) gemessen.

Zur Erstellung von DNA-Pools war eine besonders exakte Quantifizierung von DNA notwendig. Dafür wurde das *PicoGreen ds DNA Quantitation Kit* (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet.

### 2.3.3. Polymerase-Ketten-Reaktionen (PCR)

**PCR-Reaktionen.** PCR-Reaktionen (Saiki *et al.*, 1988) wurden mit den PCR-Maschinen T3 Thermocycler (Biometra, Göttingen), PTC-225 Tetrad (MJ Research, Waltham, MA, USA) oder GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) durchgeführt.

Üblicherweise erfolgten die Reaktionen in 25 $\mu$ l Ansätzen mit folgender Zusammensetzung:

2,5 $\mu$ l	PCR Puffer (10x)*
0,75 $\mu$ l	MgCl <sub>2</sub> (25mM)
2,5 $\mu$ l	dNTPs (2mM)
0,125 $\mu$ l	<i>forward primer</i> (100pmol/ $\mu$ l)
0,125 $\mu$ l	<i>reverse primer</i> (100pmol/ $\mu$ l)
0,125 $\mu$ l	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5U/ $\mu$ l oder AmpliTaq Gold Polymerase (5U/ $\mu$ l)
18,87 $\mu$ l	H <sub>2</sub> O
1 $\mu$ l	DNA-Probe (50ng/ $\mu$ l)

\* 10x PCR Puffer: 200 mM Tris-HCl (pH8,4), 500 mM KCl, mit Polymerase geliefert

Zur Amplifikation von Fragmenten für *Pyrosequencing* (Kap. 2.6.3.) und *Minisequencing* (Kap. 2.6.4.) wurde AmpliTaq Gold Polymerase (Applied Biosystems) verwendet, bei allen anderen PCR-Anwendungen wurde *Taq*-DNA-Polymerase (Invitrogen) genutzt.

Die PCR-Reaktionen wiesen grundsätzlich Profile der „stringenten“ PCR bzw. der „Standard“-PCR (siehe nächste Seite) auf; das bei den verschiedenen Primerpaaren jeweils gewählte Profil und die jeweiligen *Annealing*-Temperaturen im Falle einer „Standard-PCR“ können der Tabelle 9-1 im Anhang entnommen werden.

Zur qualitativen und quantitativen Überprüfung der PCR-Produkte wurden diese auf 1,2%-igen Agarosegelen, welchen Ethidiumbromid direkt zugegeben worden war, aufgetrennt. Dabei wurde 1xTAE als Laufpuffer verwendet.

„Stringente“-PCR:		
Temp. [°C]:	Zeit:	Anzahl der Zyklen
95	2 min	1
94	45 s	← 15
62	45 s	
72	1 min	← 30
94	45 s	
56	45 s	← 30
72	1 min	
72	8 min	1
4	halten	

„Standard“-PCR:		
Temp. [°C]:	Zeit:	Anzahl der Zyklen
95	2 min	1
94	45 s	← 45
53-61	45 s	
72	1 min	← 1
72	8 min	
4	halten	

**Aufreinigung von PCR-Produkten.** Zur Entfernung von während der PCR nicht eingebauter Primer und Nukleotide wurden drei alternative Methoden verwendet.

Unter Verwendung von Sephadexsäulen wurden die PCR-Produkte entweder direkt aufgereinigt (*QIAquick PCR Purification Kit*, Qiagen, Hilden), oder der gesamte PCR-Ansatz wurde auf einem Agarosegel aufgetrennt, die zu sequenzierende Bande ausgeschnitten und die DNA entsprechend dem Protokoll des Herstellers isoliert (*QIAquick Gel Extraction Kit*, Qiagen, Hilden).

Bei der enzymatischen Aufreinigung (siehe auch Hoogendorn *et al.*, 1999) wurden 10 µl der PCR mit 1U Shrimp Alkaline Phosphatase (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) und 1U Exonuclease I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) bei 37°C für 30 min inkubiert. Abschließend wurde das Reaktionsgemisch für 15 min auf 80°C erhitzt.

### 2.3.4. DNA-Sequenzierung

Für die Sequenzierung von PCR-Produkten wurden die Amplifizierungsprimer als Sequenzierprimer genutzt. Jede *cycle sequencing* Reaktion beinhaltete folgende Zusammensetzung:

3 µl	aufgereinigtes PCR Produkt
4 µl	<i>BigBye Terminator Reaktion Mix</i> (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
0,9 µl	Primer (10 µM)
5,6 µl	H <sub>2</sub> O

Die *cycle sequencing* Reaktionen durchliefen folgendes Profil:

Temp. [°C]:	Zeit:	Anzahl der Zyklen
96	10 min	← 30
96	10 s	
50	5 s	← 30
60	4 min	
4	halten	

Die Produkte der *cycle sequencing* Reaktionen wurden mit Filterkartuschen (Edge BioSystems, Gaithersburg, MD, USA) entsprechend den Angaben des Herstellers aufgereinigt und auf dem Sequenziergerät ABI 3700 (Applied Biosystems) analysiert.

Am MPIZ wurden die *cycle sequencing* Reaktionen, das Aufreinigen dieser Produkte und die Analyse auf den Sequenziergeräten ABI 377 und ABI 3700 (Applied Biosystems, Weiterstadt) von der Service Gruppe ADIS (Automatische DNS-Isolierung und Sequenzierung) durchgeführt. Von ADIS wurden sowohl PCR-Produkte, als auch BAC-Enden sequenziert. Bei der Sequenzierung von BAC-Enden wurden die Primer T3 und T7 als Sequenzierprimer genutzt:

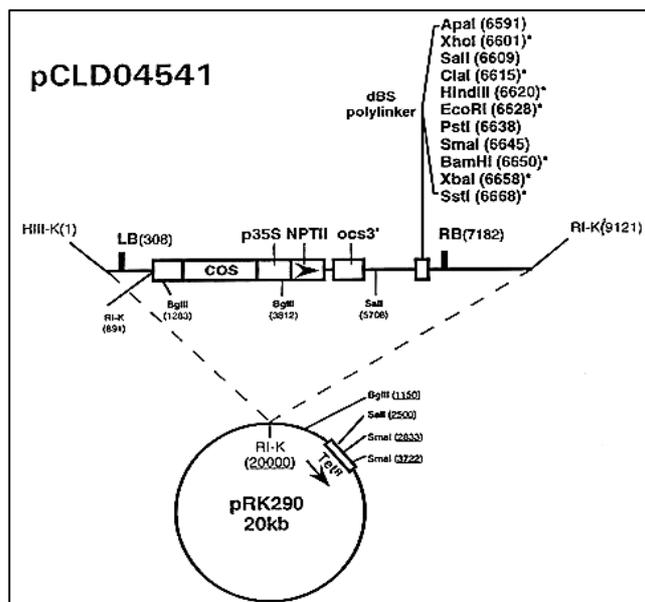
T3: 5' - AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG  
 T7: 5' - GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C

## 2.4. Identifizierung und Analyse von Polymorphismen in RGL-Kandidatenregionen

### 2.4.1. Identifizierung von RGL-Kandidatenregionen

#### 2.4.1.1. Screening einer BAC-Bibliothek

**BAC-Bibliothek.** Die genutzte BAC-Bibliothek wurde von LION Bioscience AG (Heidelberg)

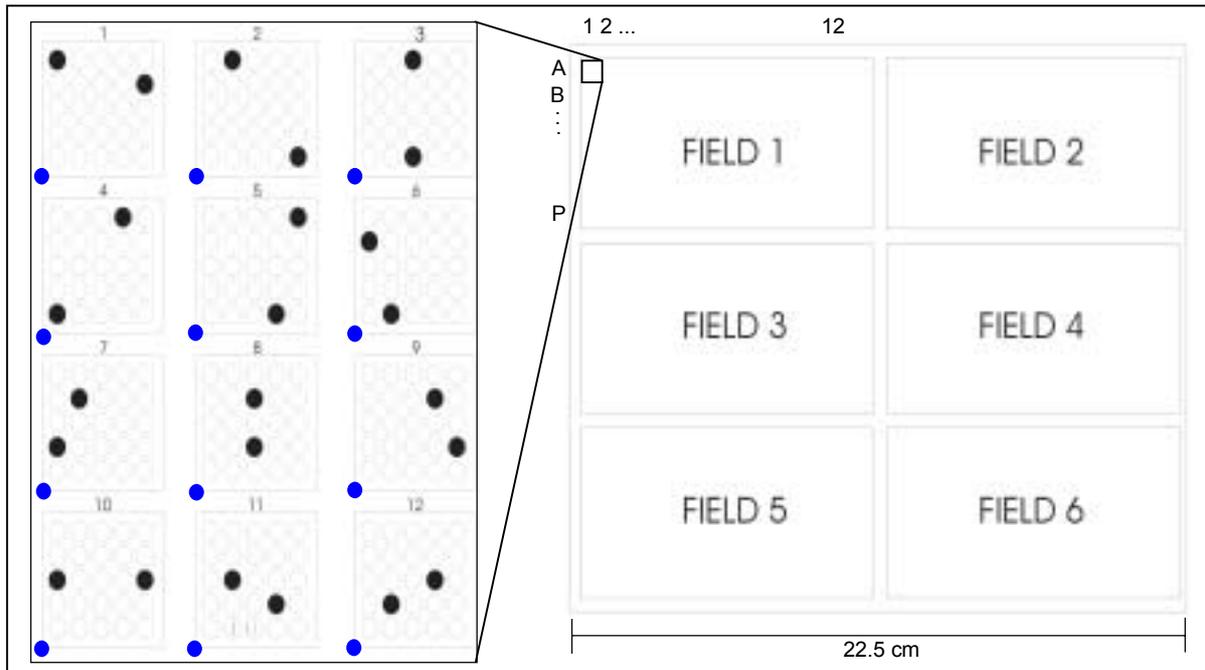


**Abb. 2-1: pCLD04541(V41)-Vektor.** LB/RB: left/right T-DNA border, \* einzigartige Restriktionsschnittstelle, NPT: Neomycin Phosphotransferase. (Abbildung aus Bancroft *et al.*, 1997 entnommen).

bereitgestellt. Zur Konstruktion der Bibliothek wurde hochmolekulare genomische DNA der diploiden Kartoffellinie P6/210 (Ballvora *et al.*, 2002; siehe auch Kap. 2.4.2.1.) partiell mit *HindIII* verdaut und in den binären Vektor pCLD04541 (Jones *et al.*, 1992; Abb.2-1) kloniert (Meksem *et al.*, 2000). Die Bibliothek besteht aus etwa 100.000 Klonen mit einer durchschnittlichen *Insertgröße* von 70 kb. Damit ergibt sich bei einer Größe des haploiden Kartoffelgenoms von ca.  $10^9$  bp eine 6- bis 7- fache Abdeckung des haploiden Genoms.

Die Klone sind in insgesamt 264 384er-Mikrotiterplatten (Genetix, Oxford, UK) angeordnet und werden in 2YT Medium (Sambrook *et al.*, 1989) mit Gefrierpuffer (5,5 % w/v Glycin, 7mM (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub>, 1,5 mM Na-Citrat, 0,3 mM MgSO<sub>4</sub>, 13 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 27 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) bei –70°C gelagert. Replikate der BAC-Bibliothek wurden mit Hilfe des Roboters BioGrid (BioRobotics, Oxford, GB) erstellt.

**Erstellen von *Macroarrays*.** Für das *Screenen* der Bibliothek wurden *Macroarrays*, Filter mit einer sehr hohen und systematisch angeordneten Koloniendichte, angefertigt.



**Abb. 2-2: Spotting-Anordnung.** Auf der Nylonmembran (rechts) werden in 6 Feldern je 2 x 12 384er-Mikrotiterplatten *aufgespottet*. Da jeder Klon zweimal in einem bestimmten Winkel entsprechend dem 5x5-Spotting-Muster (links) aufgebracht wird, ist eine Unterscheidung der Klone möglich. In jedem 5x5-Spotting-Feld ist links unten in Blau die Position des Kontrollklons eingetragen.

Dazu wurden alle Klone aus den 384er-Mikrotiterplatten mit einem BioGrid Roboter auf insgesamt vier 22,5 x 22,5 cm große Nylonmembranen (PALL, Bidyne, Portsmouth, GB) übertragen. Jede Membran war in 6 Felder eingeteilt. In jedes dieser Felder wurden in einem 5x5-Muster die Klone von 2 x 12 384er-Mikrotiterplatten inokuliert. Hierbei wurde jede Platte zweimal in einem charakteristischen Winkel aufgetragen, wodurch eine genaue Klon-Identifizierung möglich wurde (Abb. 2-2). Zur Vereinfachung der Orientierung auf dem Filter nach Hybridisierungen wurde in jeder 5x5-Anordnung der Klon pSW1 (PE Biosystems, Foster City, CA, USA) aufgebracht.

Nach dem Spotten wurden die Membranen auf LB-Medium bei 37°C für 15 h inkubiert. Anschließend erfolgte die Fixierung der DNA nach folgendem Protokoll:

- 5 min in 0,1% SDS
- 5 min in Denaturierungspuffer
- 5 min in Neutralisierungspuffer
- Backen der Filter für 2 h bei 80°C

**Hybridisierung:**

Sonden: Die zum Hybridisieren der Filter eingesetzten Sonden können folgender Tabelle 2-1 entnommen werden.

**Tab. 2-1: Zum Screenen der BAC-Bibliothek verwendete Sonden.**

(a) Sonde: Gewinnung: PCR-Produkt amplifiziert mit:		
<i>RGL121o1</i>	121o1t7C	5' - AGT ATT TCA AGC CGT ATT GGA A
	121o1t7D	5' - ATC CTG ACT CAT ACT CTC CTG
<i>RGL47f2</i>	47f2t3A	5' - ACA ACA CGA CGA TTT CT ATC AG
	47f2t3B	5' - TTC AAG ATG GTC ATG TGA TGA GG
<i>St.1.2.1</i>	1.2.1.F	5' - GAA GCT TTT CAC AAA TGT TGC
	1.2.1.R	5' - CTA ACA TAC GTT AAA CAA AAG G
<i>St.1.2.4</i>	1.2.4.F	5' - TAA CTG TCA GAC AAC AAC CAA A
	1.2.4.R	5' - ACG TGT CGT CAA TGT CAC TTT
<i>St.3.3.13</i>	3.3.13.F	5' - TTT TTG ACA CAC TCT CGT ATC A
	3.3.13.R	5' - AAA TGG TCT CTG TGA TCT ATG T

(b) Sonde:	Referenz:	Homologie zu bekanntem R-Genen
<i>RGL121o1</i>	Ballvora <i>et al.</i> , 2002	<i>Prf</i> ( <i>L. esculentum</i> ), 58%
<i>RGL47f2</i>	Ballvora <i>et al.</i> , 2002	<i>Rx</i> ( <i>S. tuberosum</i> ), 72%
<i>St.1.2.1</i>	Leister <i>et al.</i> , 1996	<i>N</i> ( <i>N. tabacum</i> ), 57%; <i>L6</i> ( <i>L. usitatissimum</i> ), 53 %
<i>St.1.2.4</i>	Leister <i>et al.</i> , 1996	<i>RPS2</i> ( <i>A. thaliana</i> ), 56%; <i>N</i> ( <i>N. tabacum</i> ), 54%
<i>St.3.3.13</i>	Leister <i>et al.</i> , 1996	<i>N</i> ( <i>N. tabacum</i> ), 82%; <i>L6</i> ( <i>L. usitatissimum</i> ), 60%

Die radioaktive Markierung von DNA-Sonden erfolgte nach der *random priming*-Methode (Feinberg und Vogelstein, 1983, 1984). Dazu wurde anschließend folgende Mischung angesetzt:

12µl (100ng)	DNA (PCR-Produkt, zuvor bei 95 °C für 5 min denaturiert und danach auf Eis gestellt)
4 µl	4 µl 5 x OLB Puffer*
3 µl	[ $\alpha^{32}$ P] - dCTP (10 µCi/µl)
1 µl	Klenow Enzyme (2U/ µl)

\* OLB Puffer (0,1 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 1 M HEPES, pH 6,6; 1 mg/ml Hexadesoxyribonucleotide pdN6 (Pharmacia); 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0;  $3,7 \times 10^{-2}$  mM MgCl<sub>2</sub>; 0,35% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol)

Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Freie Nukleotide wurden unter Verwendung einer Sephadex G50-Säule (1 ml, 10mM Tris-HCl, pH 8,1, 1mM EDTA, 0,3mM NaCl, 0.1 % SDS) abgetrennt. Abschließend wurde die eluierte, markierte DNA mit 40 µl Heringsperma-DNA (10 mg/ml) gemischt und 5 min bei 95°C denaturiert.

Hybridisierung der Filter: Die Hybridisierungen erfolgte in Glasröhren, welche bei 65°C in einem Hybridisierungssofen (Bachofer, Reutlingen) rotierten. Zur Vorhybridisierung wurden die Membranen, welche an der Wand der Hybridisierungsröhre abgerollt worden waren, für

4 h mit 20 ml Hybridisierungspuffer und 200 µl denaturierter Heringssperma-DNA im Ofen vorhybridisiert. Anschließend wurde die denaturierte Sonde (s.o.) hinzu gegeben. Die Hybridisierung fand unter gleichen Bedingungen wie die Vorhybridisierung über Nacht statt. Nach der Hybridisierung wurde der Filter in der Röhre dreimal für je 15 min bei 65°C mit 30 ml vorgewärmtem 2 x SSPE Waschpuffer gewaschen. Danach wurde der Filter aus der Röhre genommen und zweimal für je 1 h bei RT mit Southern Waschpuffer erneut gewaschen.

Schließlich wurde die Membran in Saranfolie eingeschlagen und in einer Kassette mit Verstärkerfolie (Trimax, Kodak, Rochester, USA) bei -70°C für 10 Tage mit einem Röntgenfilm (X-OMAT AR5, Kodak, Rochester, USA) exponiert. Abschließend wurde der Film entwickelt.

Strippen der Membranen: Um die Membranen für weitere Hybridisierungen nutzen zu können, wurden die radioaktiv markierten DNA-Sonden durch 30-minütiges Waschen in 0,1% SDS bei 75°C entfernt.

#### **2.4.1.2. Kartierung von BAC-Insertionen**

BAC-Insertionen, welche durch die *Screenings* der BAC-Bibliothek identifiziert worden waren, wurden mit folgenden Methoden kartiert.

##### **Kartierung anhand von Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen (RFLP):**

Auftrennung von DNA-Fragmenten auf denaturierenden Polyacrylamidgelen: Isolierte BAC-DNA (Kap. 2.3.1.) wurden mit *TaqI* oder *MseI* verdaut (Sambrook *et al.*, 1989) und, wie in Gebhardt *et al.* (1989) beschrieben, auf 4%-igen Polyacrylamidgelen aufgetrennt.

Elektroblotting: Die auf den Polyacrylamidgelen aufgetrennten DNA-Fragmente wurden durch Elektrottransfer auf Nylonmembranen (Biodyne B, Pall, Portsmouth, GB) übertragen. Der Transfer wurde 1 h bei 70 mW/cm<sup>2</sup> in 0,4 x TPE (160 mM Tris, 4 mM EDTA, pH 8,3 mit H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) durchgeführt. Anschließend wurde die DNA kovalent an die Membran gebunden, indem sie in einem Vakuumofen für 1 h bei 80°C gebacken wurde.

Hybridisierung: Die Membranen wurden, wie unter 2.4.1.1. beschrieben, hybridisiert. Dabei wurden als Sonden jeweils diejenigen PCR-Produkte verwendet, mit welchen zuvor die BACs in den entsprechenden *Screenings* identifiziert worden waren (Tab. 2-1).

Auswertung der RFLP-Muster: Die Kartierung der BAC-Insertionen erfolgte, indem darin erhaltene *TaqI*- bzw. *MseI*-Restriktionsfragmente verglichen wurden mit Kartierungsergebnissen von RFLP-Analysen, welche mit den gleichen Sonden und den

gleichen Enzymen in der Kartierungspopulation F18x40 (Kap. 2.4.2.1.) durchgeführt worden waren (Gebhardt, unveröffentlichte Daten; Leister *et al.*, 1996). Da der Elter P40 der Kartierungspopulation zu 50% an der BAC-Bibliothek beteiligt ist, konnten kartierte RFLPs BACs mit den gleichen Fragmenten zugeordnet werden.

### **Kartierung anhand von SNPs und Indels:**

Alternativ bzw. bestätigend zu den RFLP-Analysen wurden BAC-Insertionen mit Hilfe von SNPs oder Indels in Kartierungspopulationen (Kap. 2.4.2.) kartiert. Der Tabelle 3-1 sind die zu kartierenden Loci, der jeweils genutzte Polymorphismus, die verwendete Kartierungspopulation (von Ch. Gebhardt zur Verfügung gestellt, siehe auch Kap. 2.4.2.1.) und die jeweils angewandte Methode (Kap. 2.5.) zu entnehmen. Die so erhobenen Segregationsdaten wurden zur Kartierung mit dem Programm MAPRF (Ritter *et al.*, 1990) analysiert.

## **2.4.2. Identifizierung von Polymorphismen in RGL-Kandidatenregionen**

### **2.4.2.1. Pflanzenmaterial zur Identifizierung von Polymorphismen**

Bei der Zusammenstellung der Gruppe von Pflanzen, die vergleichend analysiert wurden zur direkten Identifizierung von DNA-Polymorphismen, wurde versucht, ein möglichst breit gefächertes genetisches Spektrum abzudecken. So wurden etwa sowohl diploide als auch tetraploide Genotypen untersucht. Des Weiteren sollten ebenfalls verschiedene praktische Gesichtspunkte berücksichtigt werden. Hierbei stand insbesondere die Nutzbarkeit der erhobenen Daten für laufende bzw. geplante Forschungs- und Zuchtprojekte im Vordergrund.

Im Folgenden sind einige bereits bekannte Merkmale des genutzten Pflanzenmaterials und an diesem vorgenommene Untersuchungen aufgeführt. Eine vollständige Auflistung der verwendeten Genotypen ist Tabelle 2-2 zu entnehmen.

P3 zeichnet sich durch guten Ertrag und Feldresistenz gegen *P. infestans* aus. Außerdem enthält es das *Sen1*-Gen für Resistenz gegen *Synchytrium endobioticum* (Hehl *et al.*, 1999). P38 weist allgemein gute Resistenzeigenschaften auf, wobei diese bisher noch nicht genauer untersucht wurden (Ch. Gebhardt, persönliche Mitteilung). P18 trägt das *Rx1*-Gen für Resistenz gegen *Potato Virus X* (PVX) (Ritter *et al.*, 1991). P40 hat das *Gro1*-Gen für Resistenz gegen den Wurzelnematoden *Globodera rostochiensis* (Barone *et al.*, 1990). P50 wurde wegen der hohen quantitativen Resistenz gegen den Wurzelnematoden *Globodera pallida* ausgewählt. P54 zeichnet sich durch einen geringen Anteil an reduzierenden Zuckern in der Knolle nach einer Lagerungsphase aus. G87 zeigt einen mittleren Grad an

Feldresistenz gegen *P. infestans* und besitzt keine bekannten *R*-Gene. DG83 besitzt eine hohe Resistenz gegen Befall durch *Erwinia carotovora* ssp *atroseptica*, gegen Kartoffelkrebs (*Synchytrium endobioticum*), sowie gegen die Viren *Potato Leaf Roll Virus* (PLRV), *Potato Virus Y* (PVY) und *Potato Virus X* (PVX) .

DG81 zeigt ebenfalls Resistenz gegen PVX, ist allerdings gegen *Erwinia carotovora* ssp *atroseptica* und *Synchytrium endobioticum* anfällig. Ergänzend zu den beschriebenen diploiden *Solanum tuberosum* Linien wurde auch ein diploider *Solanum phureja* Genotyp in das Datenset aufgenommen.

P3 und P38 sind die Eltern der F1-Hybrid-Familie K31. Diese Population ist auf QTL für Stärkegehalt und Ertrag (Schäfer-Pregl *et al.*, 1998) und QTL bezüglich Resistenz gegen *P. infestans* untersucht worden (Oberhagemann *et al.*, 1999).

P18 und P40 sind die Eltern der F1-Hybrid-Familie F1840. Mit dieser Population ist eine RFLP-Karte erstellt worden (Gebhardt *et al.*, 1991), sind der *Gro1*-Locus für Nematodenresistenz hoch auflösend (Ballvora *et al.*, 1995; Ballvora *et al.*, 2002) und RGLs (Leister *et al.*, 1996) kartiert worden, und es ist eine vergleichende Kartierung mit *Arabidopsis thaliana* durchgeführt worden (Gebhardt *et al.*, unveröffentlichte Daten).

Mit P18 und P50 ist die F1-Hybrid-Familie H94C erstellt worden, und P54 und P40 sind die Eltern der F1-Hybrid-Familie H94A. Beide Populationen sind auf QTLs für Stärkegehalt, Ertrag und Gehalt an reduzierende Zuckern in der Knolle nach einer Lagerungsphase untersucht worden (Menendez *et al.*, Manuskript in Vorbereitung). Des Weiteren ist die Population auf QTL für Resistenz gegen *Globodera pallida* (Ch. Gebhardt, unveröffentlichte Daten) analysiert worden.

Aus der Kreuzung zwischen P40 und P41 resultiert die F1-Hybride P6/210. Dieser Klon wurde zur Konstruktion der in dieser Arbeit verwendeten BAC-Bibliothek (Kap. 2.4.1.1.) genutzt.

DG81 und DG83 sind die Eltern der F1-Hybrid-Familie „*Erwinia* Population“. Mit dieser Population wurden QTLs für Resistenz gegen *Erwinia carotovora* ssp *atroseptica* (Zimnoch-Guzowska *et al.*, 2000) und gegen PLRV (Marczewski *et al.*, 2001) kartiert.

Das tetraploide Pflanzenmaterial wurde freundlicherweise von den Firmen Nordkartoffel Zuchtgesellschaft mbH und Saka-Ragis zur Verfügung gestellt.

SR5 und NKA1 weisen Resistenz gegen den Wurzelneematoden *Globodera pallida* auf, im Gegensatz zu den Genotypen SR6 und NKA2, die diesbezüglich anfällig sind.

SR1, SR3, NKA5, NKA7 sowie Escort und Nikita zeigen Feldresistenz gegen *P. infestans*, wohingegen SR2, SR4, NKA6, NKA8 und Leyla bezüglich dieses Merkmales anfällig sind.

Mit diesem tetraploiden Pflanzenmaterial wurden bezüglich der beiden Resistenzmerkmale segregierende Kreuzungsnachkommenschaften erstellt.

F1-Hybrid-Populationen aus den Kreuzungen Nikita x Leyla und Escort x Leyla sind im Rahmen dieser Arbeit für eine QTL-Analyse genutzt worden (Kap. 2.6.).

**Tab. 2-2: Auflistung der verwendeten Pflanzen zur Identifizierung von allelischen Variationen**

Abkürzung	Name	Polyploidie	zur Verfügung gestellt von
3	P3 = H80.577/1	2n	MPIZ (Köln)
38	P38 = H80.576/16	2n	MPIZ (Köln)
18	P18 = H82.337/49	2n	MPIZ (Köln)
41	P41=H79.1506/6	2n	MPIZ (Köln)
40	P40 = H80.696/4	2n	MPIZ (Köln)
50	P50 = H82.2032/1	2n	MPIZ (Köln)
54	P54 = H81.839/1	2n	MPIZ (Köln)
G87	G87D2.4.1	2n	GERMICOPA (Quimper Cedex, Frankreich)
DG81	DG 81-68	2n	IHAR (Mlochów, Polen)
DG83	DG 83-2025	2n	IHAR (Mlochów, Polen)
S.ph.	<i>Solanum phureja</i>	2n	CIP (Lima, Peru)
NKA1	E92/122	4n	Nordkartoffel (Ebstorf)
NKA2	K4023	4n	Nordkartoffel (Ebstorf)
NKA3	L287/89	4n	Nordkartoffel (Ebstorf)
NKA4	BZ4696	4n	Nordkartoffel (Ebstorf)
NKA5	BZ3886	4n	Nordkartoffel (Ebstorf)
NKA6	L320/88	4n	Nordkartoffel (Ebstorf)
NKA7	BZ3607	4n	Nordkartoffel (Ebstorf)
NKA8	L20/89	4n	Nordkartoffel (Ebstorf)
SR1	GPhy-1-A	4n	Saka Ragis (Windeby)
SR2	GPhy-1-B	4n	Saka Ragis (Windeby)
SR3	GPhy-2-A	4n	Saka Ragis (Windeby)
SR4	GPhy-2-B	4n	Saka Ragis (Windeby)
SR5	GPa-1-A	4n	Saka Ragis (Windeby)
SR6	GPa-1-B	4n	Saka Ragis (Windeby)
N	Nikita	4n	Saka Ragis (Windeby)
E	Escort	4n	Saka Ragis (Windeby)
L	Leyla	4n	Saka Ragis (Windeby)

#### 2.4.2.2. Vergleichendes Sequenzieren und Sequenzanalyse

Zur Identifizierung DNA Variationen wurden homologe Loci in 28 verschiedenen Genotypen (Tabelle 2-3) vergleichend sequenziert (Kap. 2.3.4.).

Sequenzanalysen wurden mit dem GCG-Package für UNIX, Version 10 (Genetics Computer Group, Winsconsin, USA) und dem Programm CLUSTALW (Higgins und Sharp, 1988) durchgeführt. Mit diesen Programmen erstellte *Alignments* für den Vergleich von homologen Sequenzen wurden üblicherweise manuell überprüft und ggf. korrigiert.

Für Datenbankrecherchen wurde GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) genutzt.

#### 2.4.2.3. Dokumentation und Analyse von SNPs und Indels

In Zusammenarbeit mit Svenja Meyer und Axel Nagel vom Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH (Berlin) wurden mit Oracle (Version 8.1.7.; Oracle Corporation, Redwood Shores, CA, USA) eine Datenbank erstellt, in welcher alle identifizierten SNPs und

Indels in einer dokumentiert sind. Zur statistischen Auswertung der SNP- und Indel-Daten wurden SQL-Abfragen durchgeführt.

Zur Abschätzung der Variabilität des Genpools wurde die Nukleotid-Diversität nach

folgender Formel (Nei, 1987; Li, 1997) berechnet:  $\pi = \frac{1}{L} \frac{n}{n-1} \sum_{i,j} x_i x_j \Pi_{ij}$ . Hierbei ist  $L$  die

betrachtete Sequenzlänge,  $n$  die Anzahl der Chromosomen,  $x_i$  und  $x_j$  sind die jeweiligen Frequenzen der Allele und  $\Pi_{ij}$  ist Anzahl der SNPs.

## 2.5. Methoden zum Genotypisieren von Polymorphismen

### 2.5.1. *BigDye-Sequencing*

PCR-Produkte, welche den zu analysierenden SNP beinhalten, wurden, wie in Kapitel 2.3.4. beschrieben, sequenziert. Zur quantitativen Auswertung der Polymorphismen wurden die Peakhöhen der allelischen Basen in den Elektropherogrammen manuell vermessen und in Prozentwerte und schließlich Allelverhältnisse umgerechnet.

### 2.5.2. PCR-basierte Genotypisierungsmethoden

Bei allelspezifischen PCRs (Bottema *et al.*, 1993) wurden auf Basis einer bekannten allelischen Variation jeweils ein Amplifikationsprimer so entworfen, dass er nur spezifisch bei einem Allel bindet (ASO = *allele specific oligonucleotide*) und somit auch nur dieses amplifiziert wird.

Bei DFLP- (*DNA fragment length polymorphisms*) Analysen wurden Fragmente amplifiziert, welche allelische Deletion/Insertion aufweisen. Die PCR-Produkte zeigen somit Längenunterschiede.

Die Produkte der PCR-basierten Genotypisierungsmethoden wurden auf Agarosegelen aufgetrennt. Im Rahmen dieser Arbeit entworfene ASOs für PCR-basierten Genotypisierungsmethoden können Tabelle 9-8 im Anhang entnommen werden.

### 2.5.3. SNUPE in Kombination mit DHPLC (*Minisequencing*)

#### 2.5.3.1. Primer-Extension

Als *Templates* für die Primer-Extension-Reaktionen dienten enzymatisch aufgereinigte PCR-Produkte (Kap. 2.3.3.; für Oligonukleotidsequenzen siehe Tabelle in 9-1), welche den zu untersuchenden Polymorphismus beinhalten.

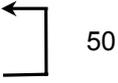
Die verwendeten Extension-Primer (Tabelle in 9-3) wurden so entworfen, dass das 3'-Ende unmittelbar vor dem SNP liegt. Abhängig von dem an das HPLC-Instrument (s.u.) angeschlossenen Detektionssystem wurden entweder unmarkierte oder Fluoreszenz-markierte Extensionsprimer verwendet. Den Extensions-Reaktionen wurden die potentiell passenden, allelischen Nukleotide zugesetzt. Die Reaktionen erfolgten in 20 µl Ansätzen mit folgender Zusammensetzung:

4 µl	Reaktionspuffer (5x)*
2 µl	dXTPs (500µM)
2 µl	dYTPs (500µM)
[2 µl] <sup>+</sup>	[dZTPs (500µM)] <sup>+</sup>
2 µl	Extensions Primer (10ng/ µl)
0.5 µl	Thermo Sequenase (1U/µl)
8,5 µl [6,5µl] <sup>+</sup>	H <sub>2</sub> O
1 µl	enzymatisch aufgereinigtes PCR-Produkt (50ng/µl)

\* 5x PCR Puffer: 260 mM Tris-HCl (pH9,5), 65 mM MgCl<sub>2</sub>, wurde mit Sequenase geliefert

<sup>+</sup> Werte für Analyse von triallelischen SNPs

Die Extensions-Reaktionen durchliefen folgendes PCR-Profil:

Temp. [°C]:	Zeit:	Anzahl der Zyklen
95	2 min	1
94	8 s	
43	8 s	
60	8 s	
94	30 s	1
4	halten	

Die Extensions-Produkte wurden anschließend mittels DHPLC (*denaturing high performance liquid chromatography*) aufgetrennt.

#### 2.5.3.2. DHPLC

**DHPLC-Analyse mit unmarkierten Extensions-Primern.** Die Analyse von unmarkierten Extensions-Produkten wurde auf einer HPLC-Maschine Varian Helix System (Varian, Palo Alto, CA, USA), welche mit einem *Autosampler* für Mikrotiterplatten ausgestattet war, ausgeführt. Dazu wurden 7 bis 12 µl der Extensionsreaktion in eine DNaseq Säule (Transgenomic, Santa Clara, CA, USA) bei 60 bis 90°C injiziert. Die Produkte wurden von

der Säule eluiert, indem ein linearer Acetonitril Gradient bei einer konstanten Flussrate von 0,9 ml/min (bzw. 2,5  $\mu$ l/min bei 16-Array, s.u.) angelegt wurde. Der Gradient kam durch eine Konzentrationssteigerung des Puffers B (0,1 M Triethylammonium, 0,1 mM Na<sub>4</sub>.EDTA, pH 7,0, Acetat, 25% Acetonitril) relativ zu Puffer A (0,1 M Triethylammonium, 0,1 mM Na<sub>4</sub>.EDTA, pH 7,0) zustande. Nach jeder Elution wurde die Säule durch eine Erhöhung des Anteils von Puffers B auf 95% gewaschen.

Die jeweils spezifischen Bedingungen (Injektionsvolumen, Temperatur, Gradient) der einzelnen Assays können der Tabelle 9-4 im Anhang entnommen werden.

Die eluierten Oligonukleotide wurden über UV-Detektion bei 260 nm nachgewiesen.

**Simultane DHPLC-Analyse mit markierten Extensions-Primern.** Eine simultane Analyse von Primer-Extension-Produkten wurde auf einem neu entwickelten HPLC-Instrument mit 16 parallelen Säulen (16-Array-HPLC, Abb. 2-3) untersucht (Premstaller *et al.*, 2002). Da hierbei zur Detektion von Eluaten ein Laser genutzt wurde, konnten mit HEX, TAMRA, NED, ROX oder FAM fluoreszenzmarkierte Extensions-Primer eingesetzt werden. Somit war es möglich, in einer einzelnen Säule mehrere, mit verschiedenen Fluoreszenzmolekülen markierte Proben zu analysieren. Dazu wurden die Proben nach getrennter Primer-Extension-Reaktion gemischt und zusammen injiziert. Die spezifischen Bedingungen sind der Tabelle 9-4 zu entnehmen.

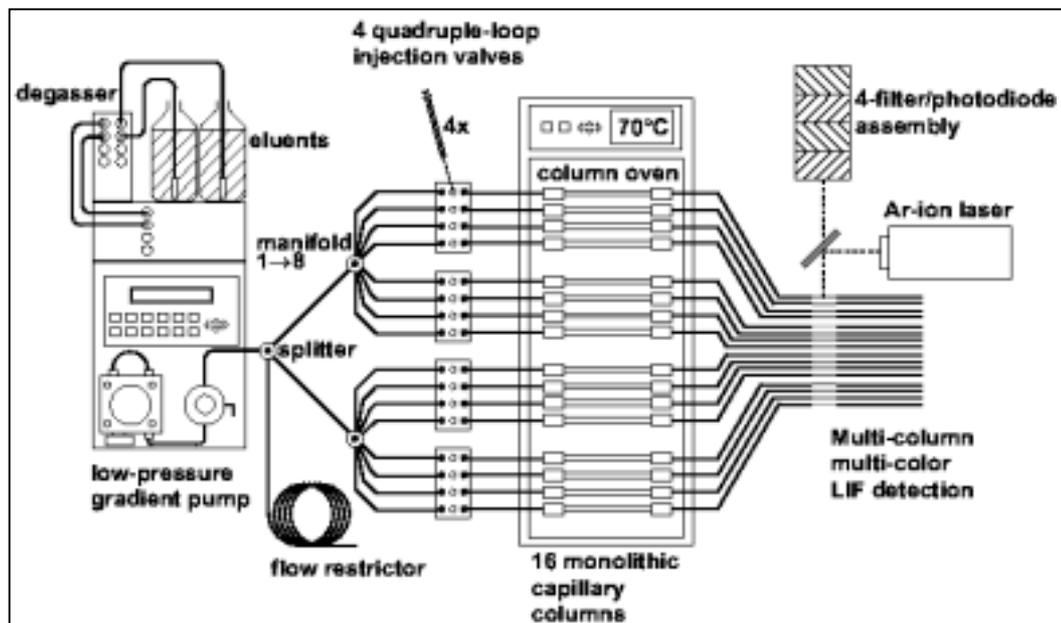


Abb. 2-3: Schematische Darstellung des HPLC-Instrumentens (16-Array-HPLC) zur simultanen Analyse von SNUPE-Produkten in 16 Säulen (Abbildung Premstaller *et al.*, 2002 entnommen).

### 2.5.3.3. Kalibrierung und Auswertung der SNUPE-Reaktionen

Da bei Primer-Extensions-Reaktionen eine variable Effizienz beim Einbau von allelischen Nukleotiden zu beobachten ist (Hoogendorn *et al.*, 2000), war es nicht möglich, bei heterozygoten Proben das Verhältnis von den Peakhöhen der Chromatogramme direkt der

Allelverteilung gleichzusetzen. Für quantitative Aussagen zu Allelverhältnissen war es deshalb erforderlich, jeden Assay zu kalibrieren.

Dafür konnten entweder Proben von bekannten, heterozygoten „2-2“-Individuen genutzt werden, oder es wurden entsprechende Verhältnisse künstlich hergestellt. Dazu wurden zwei Oligonukleotide synthetisiert (Tab. 9-5), welche den beiden Allelen entsprachen und in der Primer-Extension-Reaktion als *Templates* dienen konnten. Diese Oligonukleotide wurden dann im 1:1-Verhältnis gemischt.

Anhand der Peakhöhen dieser definierten Heterozygoten bzw. der entsprechenden Oligonukleotidmischungen konnten für jeden Assay Korrekturfaktoren (k) berechnet werden, mit welchen die Peakhöhen bei anderen heterozygoten Proben multipliziert werden konnten und somit Aussagen über die Allelverteilung möglich wurden.

## 2.5.4. Allelspezifische Hybridisierung auf DNA-Chips

Die Experimente zur allelspezifischen Hybridisierung auf DNA-Chips wurden in Zusammenarbeit mit Ulrich Matzner von der Firma Alpha Technology GmbH (Hürth) durchgeführt.

### 2.5.4.1. Erstellen der DNA-Chips für die allelspezifische Hybridisierung

Pro SNP wurden 24 5'-SH-modifizierte und drei 5'-NH<sub>2</sub>-modifizierte 22-mer Oligonukleotide mit Linkern (5' – SH/NH<sub>2</sub> – C<sub>6</sub>-Linker – 22 sequenzspezifische Nukleotide) als DNA-Sonden (= Fänger-Oligonukleotide) verwendet (Interactiva, Ulm). Je 12 Oligonukleotide haben *sense*- bzw. *antisense* Orientierung. Die 12 Oligonukleotide jeder Klasse teilen sich in drei Gruppen von je vier Oligonukleotiden auf. Die drei Gruppen unterscheiden sich in ihrer relativen Lage zum SNP (Positionen 11, 14 und 17 vom 5'-Ende). Die vier Oligonukleotide einer Gruppe unterscheiden sich nur bezüglich des SNPs (A, C, G oder T). Die verwendeten Oligonukleotide sind Tabelle 9-6 zu entnehmen.

Die DNA-Sonden (10-20 µM) wurden mit Hilfe des Roboters BioGrid (BioRobotics, Oxford, GB) auf Glasobjektträger (75 x 25 mm) von Quantifoil (Jena) aufgespottet und durch kovalente Bindung auf der Epoxy- oder alternativ auf der Aldehyd-aktivierten Oberfläche immobilisiert. Hierbei wurde entsprechend dem Herstellerprotokoll unter Verwendung des Kopplungspuffers 2 x *QTM Spotting Solution* (Quantifoil, Jena) vorgegangen.

Unmittelbar vor der Hybridisierung wurden die *Microarrays* nach folgendem Protokoll gewaschen und blockiert:

*QMT Blocking Solution*  
(Quantifoil, Jena)  
ddH<sub>2</sub>O pH 4.0

4x *QMT Blocking Solution* 1:4 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnen  
1/50.000 Vol 37% HCl zugeben (2µl pro 100ml)  
1000 ml ddH<sub>2</sub>O mit 6N HCl einstellen (ca. 15µl)

- 5 Min. 0.1% Triton bei RT
- 2 Min. ddH<sub>2</sub>O pH 4.0 bei RT
- 2 Min. ddH<sub>2</sub>O pH 4.0 bei RT
- 10 Min. 100 mM KCl bei RT
- 1 Min. ddH<sub>2</sub>O bei RT
- 15 Min. *QMT Blocking Solution* bei 50°C
- 1 Min. ddH<sub>2</sub>O bei RT
- Trocknen im Stickstoffstrom

#### 2.5.4.2. Amplifizierung und Markierung der Zielsequenzen

Die Zielsequenzen, welche die polymorphe Position beinhalten, wurden durch PCR-Reaktionen (Kap. 2.3.3.; Primersequenzen Tab. 9-1) amplifiziert. Durch die Verwendung von fluoreszenzmarkierten Nukleotiden (Cy3-dUTPs, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) erfolgte eine Markierung der 200 bis 400bp großen Fragmente. Die PCR-Reaktionen erfolgten in 50 µl Ansätzen mit folgender Zusammensetzung:

5 µl	PCR Puffer (10x)*
3 µl	MgCl <sub>2</sub> (25mM)
0,5 µl	10% Triton x-100
1,25 µl	dNTPs (2mM) (ohne dTTP)
2,5 µl	Cy3-dUTP/dTTP <sup>+</sup> (1mM)
0,25 µl	<i>forward primer</i> (100pmol/ µl)
0,25 µl	<i>reverse primer</i> (100pmol/ µl)
0,25 µl	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5U/µl)
35,5 µl	H <sub>2</sub> O
1 µl	DNA-Probe (50ng/µl)

\* 10x PCR Puffer: 200 mM Tris-HCl (pH8,4), 500 mM KCl, mit Polymerase geliefert

+ Cy3-dUTP und dTTP im Verhältnis 1:5 gemischt

Im Anschluss an die PCR wurden die Produkte mit Sephadexsäulen (Quiagen), wie in Kapitel 2.3.3. beschrieben, aufgereinigt.

#### 2.5.4.3. Hybridisierung und Waschen

Unmittelbar nach dem Waschen und Blockieren (Kap. 2.5.4.1.) wurden die *Microarrays* mit den markierten Zielsequenzen (Kap. 2.5.4.2.) entsprechend folgendem Protokoll hybridisiert:

Chip-Hybridisierungspuffer 10mM Tris/HCl 7,5, 1mM EDTA, 0,6 M NaCl, 1x Denhardts, 0,1mg/ml Heringssperma, 10% bis 50% Formamid  
oder: QTM Hybridisierungspuffer (Quantifoil, Jena): Formamid-frei, unbekannte Ionenstärke

- 1 Vol. gemischte Zielsequenzen in 9 Vol. Chip-Hybridisierungspuffer aufnehmen
- Hybridisierungsmix 5 Min. bei 95 °C denaturieren und sofort auf Eis stellen
- *Microarray* unter Verwendung von Hybridisierungsrähmchen (GeneScan, Freiburg) mit Hybridisierungsmix überschichten
- *Microarray* unter Rotation 4 h bei 42°C hybridisieren

Nach der Hybridisierung wurden die *Microarrays* folgender Waschprozedur unterzogen:

- 10 Min. 39 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 7,5 bei 32°C
- 10 Min. 19,5 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 7,5 bei 32°C
- Trocknen im Stickstoffstrom

#### **2.5.4.4. Auswertung der allelspezifischen Hybridisierung auf DNA-Chips**

Das Auslesen der hybridisierten *Microarrays* erfolgte mit einem Fluoreszenzscanner GenePix™ 4000B (Axon Instruments, Union City, CA, USA) und die Bildauswertung wurde mit der Analysesoftware GenePix™ Pro (Axon Instruments, Union City, CA, USA) durchgeführt.

### **2.5.5. Primer-Elongation auf DNA-Chips**

Die Experimente zur Primer-Elongation auf DNA-Chips wurden in Zusammenarbeit mit Ulrich Matzner von der Firma Alpha Technology GmbH (Hürth) durchgeführt.

#### **2.5.5.1. Erstellen der DNA-Chips für die Primer-Elongation**

Für jeden SNP wurden vier 5'-SH-modifizierte 50-merer Oligonukleotide mit Linkern (5' – SH – C<sub>6</sub>-Linker – 50 sequenzspezifische Nukleotide) als immobilisierte Primer verwendet (Interactiva, Ulm). Die vier Oligos wurden so entworfen, dass sie sich nur bezüglich der SNP-Stelle (A, C, G oder T) unterscheiden, und diese sich am terminalen 3'-Ende befindet. Die verwendeten Oligonukleotide sind Tabelle 9-7 zu entnehmen.

Die Primer wurden, wie bei der Erstellung der *Microarrays* für die allelspezifische Hybridisierung auf DNA-Chips (Kap. 2.5.4.1.), auf die Epoxyoberfläche der Glasobjektträger *gespottet* und dort immobilisiert.

#### **2.5.5.2. Amplifizierung der Zielsequenzen**

Die Zielsequenzen wurden durch jeweils separate PCRs amplifiziert (Kap. 2.3.3.).

#### **2.5.5.3. Primer-Elongation auf DNA-Chips (*solid phase PCR*)**

Die Primer-Elongation entspricht einer PCR, bei welcher die immobilisierten Oligonukleotide auf dem DNA-Chip als Primer dienen (*solid phase PCR*) und die amplifizierte Zielsequenz als *Template* (Kap. 2.5.5.2.) fungiert.

Die PCR-Reaktionen erfolgten in 60 µl Ansätzen mit folgender Zusammensetzung:

6 µl	PCR Puffer (10x)*
3,6 µl	MgCl <sub>2</sub> (25mM)
5 µl	dNTPs (je 1mM) (ohne dTTP)
2,5 µl	Cy3-dUTP (1mM)
2 µl	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5U/µl)
30,9 µl	H <sub>2</sub> O
10 µl	amplifizierte Zielsequenz (50ng/µl)

\* 10x PCR Puffer: 200 mM Tris-HCl (pH8,4), 500 mM KCl, mit Polymerase geliefert

Durch die Verwendung von Hybridisierungsrähmchen (GeneScan, Freiburg) konnten auf den *Microarrays* Kammern über dem Bereiche mit den immobilisierten Primern geschaffen werden, in welche der PCR-Reaktionsmix pipettiert wurde.

Anschließend erfolgte die Elongationsreaktion in einem *In Situ* Thermocycler (OmniSlide, Hybaid, Heidelberg) mit drei alternativen Profilen, welche sich bezüglich der *Annealing*- und Extensionszeiten unterschieden:

Temp. [°C]:	Zeit:	Anzahl der Zyklen
90	3 min	1
90	15 / 23 / 30 s	 15
56	30 s	
72	8 / 12 / 15 s	
94	30 s	1
4	halten	

Im Anschluss an die Elongationsreaktion wurden die *Microarrays* dreimal für je 10 Minuten in MilliQ Wasser gewaschen.

#### 2.5.5.4. Auswertung der Primer-Elongation auf DNA-Chips

Das Auslesen und Analysieren der *Microarrays* erfolgte wie in Kapitel 2.5.4.4. beschrieben.

### 2.5.6. Pyrosequencing

#### 2.5.6.1. Präparation von einzelsträngiger DNA und Binden des Sequenzier-Primers

Mit Hilfe von PCR-Reaktionen (Kap. 2.3.3.) wurden 200 bis 400 bp große Fragmente amplifiziert, welche die polymorphe Position beinhalteten.

Jeweils einer der Amplifikationsprimer (Tab. 9-2) war am 5'-Ende mit Biotin markiert. Aufgrund dieser Modifikation konnte der zu sequenzierende Strang isoliert werden, indem die PCR-Produkte an Streptavidin-beschichteten, paramagnetischen Kügelchen (Dynabeads™ M-280, Dynal ASA, Oslo, Norwegen) immobilisiert wurden. Dafür wurden 25 µl der PCR-Reaktion mit 12 µl Dynabeads™ (10 µg/µl) und 37 µl 2x *binding-washing buffer*

(0,05% Tween 20, 0,5 mM EDTA, 1 M NaCl, 5 mM Tris-HCl, pH 7,6) für 20 min bei 65°C unter konstantem Schütteln in einem Heizschüttler (Thermomixer R, Eppendorf AG, Hamburg) inkubiert.

Die immobilisierten Proben wurden in den folgenden Schritten mit Hilfe einer multimagnetischen Präparationshilfe (Luc96 Sample Prep Tool, Pyrosequencing AB, Uppsala, Schweden) im 96er Format transferiert. Die PCR-Produkte wurden zunächst 1 min in 50 µl 0,5 M NaOH denaturiert, und dann durch einmaliges Eintauchen in 100 µl 1x *annealing buffer* (20 mM Tris-Acetat, 5 mM Mg-Acetat, pH 7,6) gewaschen. Anschließend wurden die nun einzelsträngig vorliegenden DNA-Stränge in 40 µl 1x *annealing buffer* plus 5 µl Sequenzierprimer (20 pmoles in H<sub>2</sub>O) übertragen.

Zum Binden des Primers wurden die Proben für 2 min auf 80°C in einem Thermozykler (GeneAmp® PCR System 9700) erhitzt. Nachdem die Proben wieder Raumtemperatur erreicht hatten, konnten die Sequenzierreaktionen durchgeführt werden.

#### 2.5.6.2. Entwerfen der Sequenzier-Primer

Für die Qualität der Ergebnisse sind die Eigenschaften des Sequenzier-Primers entscheidend. Zum Vermeiden von Primerdimeren und *Hairpins* wurden alle Sequenzierprimer mit dem Programm Oligo 4.0 (Molecular Biology Insights, Inc., Cascade, CO, USA) entworfen. Bei der Auswahl des bestmöglichen Primers wurde der gegebene Spielraum ausgenutzt, da sowohl *sense*- als auch *antisense*-Strang als *Template* dienen können, der Primer bis zu 5 Basen *downstream* vom SNP binden und die *Annealing*-Temperatur zwischen 40°C und 60°C liegen kann.

#### 2.5.6.3. Pyrosequencing-Reaktion

Die *Pyrosequencing*-Reaktionen wurden in 96er-Mikrotiterplatten (Luc96™, Pyrosequencing AB) im automatisierten PSQ™96 (Pyrosequencing AB, Uppsala, Schweden) ausgeführt. Die wesentlichen Bestandteile dieses Instrumentes sind eine Schüttlerhalterung für die Mikrotiterplatte, eine austauschbare Injektionskartusche zur exakten Zugabe der Reagenzien und eine gekühlte DDC-Kamera (*Charged Doubled Device*). Vor der Reaktion musste die Kartusche mit den Enzymen, dem Substrat und den vier Nukleotiden entsprechend den Angaben des Herstellers (SNP Reagent Kit, Pyrosequencing AB) befüllt werden.

Während des Laufes wurden die Nukleotide jeweils in Sequenz-spezifischer Reihenfolge automatisch zugefügt. Zur Festlegung der Dispensionsabfolge wurde das Programm Peak Height Determination Prototype SW (Pyrosequencing AB) genutzt. Grundsätzlich wird dabei folgendes Schema eingehalten:

- 1 Nukleotid, das bei gegebener Sequenz nicht eingebaut werden dürfte, als Negativkontrolle

- passende Nukleotide bis zum SNP
- beide Nukleotide des SNPs
- 1 Nukleotid, das bei gegebener Sequenz nicht eingebaut werden dürfte, als Negativkontrolle
- mindestens 1 passendes Nukleotid nach der polymorphen Stelle

Als Beispiel folgen die zu sequenzierende Sequenz von BA73e8t3/SNP65 und die dazugehörige Dispensionsreihenfolge:

BA73e8t3/SNP65	1. Allel	T A	C A A
	2. Allel	T G	C A A
	Dispension	C T A G T C A	

Da die genutzte Software kein Modul zum Genotypisieren von Indels, trialleischen SNPs und mehreren aufeinander folgenden SNPs beinhaltet, musste in diesen Fällen die Nukleotidzugabe manuell festgelegt werden (Tab. 9-9).

#### 2.5.6.4. Auswertung der *Pyrosequencing*-Reaktion

Das Programm Peak Height Determination Prototype SW konnte ebenfalls zur quantitativen Auswertung der Pyrogramme verwendet werden, da hiermit die Peakhöhen der polymorphen Basen in Prozentverhältnisse konvertiert werden. Lediglich zur Analyse der Polymorphismen, welche keinem binären SNP entsprachen (Kap. 2.5.6.3.; Tab. 9-9.) wurden die Peakhöhen der Pyrogramme manuell vermessen und in Prozentwerte und schließlich Allelverhältnisse umgerechnet.

#### 2.5.6.5. Verwendung von SSB

Bei *Pyrosequencing*-Assays, die unter den oben aufgeführten Standardbedingungen keine auswertbaren Ergebnisse lieferten, wurde der Einfluss von *single-strand DNA binding protein* (SSB) auf die Reaktion getestet, indem 0,5 µg, 1,0 µg und 1,5 µg SSB (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) den Proben direkt vor der Sequenzierreaktion zugegeben wurden.

## 2.6. QTL Analyse

### 2.6.1. Pflanzenmaterial und Feldversuche für die QTL Analyse

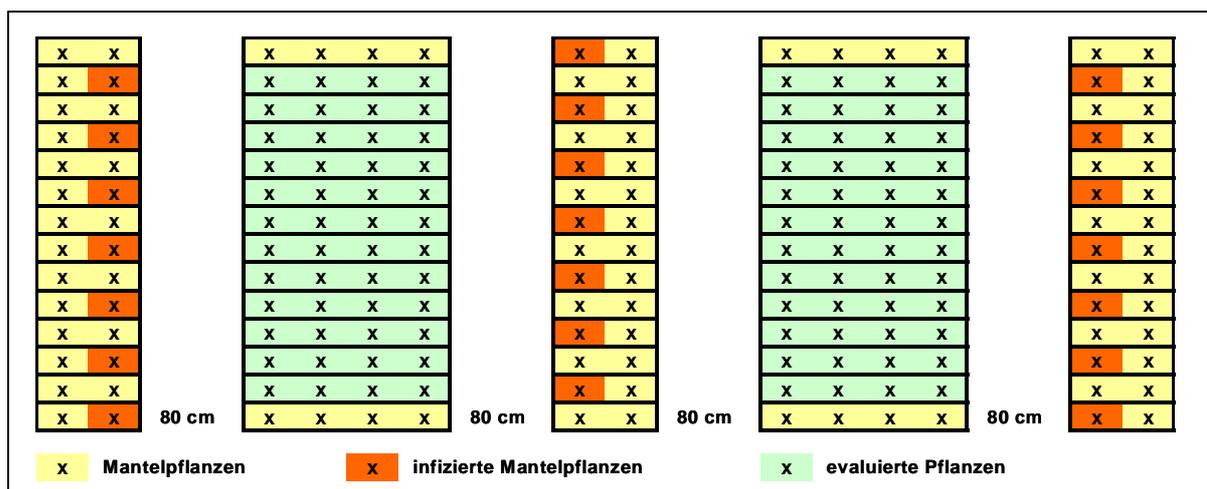
Sowohl die Kreuzungen als auch die Feldversuche wurden im Rahmen einer Kooperation von der Firma Saka-Ragis Pflanzenzucht GbR in Windeby (Norddeutschland) durchgeführt.

**Pflanzenmaterial.** Für QTL-Analysen zur Resistenz gegen *P. infestans* wurden F1-Hybrid-Populationen aus den Kreuzungen Nikita x Leyla und Escort x Leyla genutzt (Kap. 2.4.2.1.). Diese Genotypen wurden ausgewählt, da Escort und Nikita Feldresistenz gegen *P. infestans* aufweisen, wohingegen Leyla bezüglich dieses Merkmales anfällig ist.

Die F1-Population aus der Kreuzung Nikita x Leyla umfasste insgesamt 93 Individuen, in der F1-Population aus der Kreuzung Escort x Leyla befanden sich insgesamt 79 Individuen.

**Feldversuche.** Um eine natürliche Infektion zu simulieren, wurde eine Sorte mittlerer Anfälligkeit, welche die Prüfpflanzen umgaben, künstlich mit *P. infestans* infiziert (Abb. 2-4). Für die Infektion wurden einige Blätter dieser Pflanzen mit einer Sporangien/Zoosporensuspension besprüht, welche zuvor aus einem Isolat mit den Virulenzen 1 bis 11 gewonnen worden war. Von diesen Infektionsherden ging dann die Infektion auf die Prüfpflanzen über. Die Inokulationen erfolgten 7 bis 9 Wochen nachdem die Knollen gepflanzt worden waren. Auf der Basis der Reifeboniturdaten des Jahres 1999 wurden die Pflanzen in frühreife (Boniturwert 1 bis 3) und spätreife Genotypen (Boniturwert 4 bis 9) eingeteilt. Die spätreifen Genotypen wurden 1 bis 2 Wochen früher infiziert als die frühreifen Pflanzen.

Die Bonituren zur Resistenz wurden in den Jahren 2000 und 2001 an 9 verschiedenen Tagen in Intervallen von 3 bis 4 Tagen erhoben und mit einer Skala von 1 (hoch resistent) bis 9 (hoch anfällig) bewertet (Cruickshank *et al.*, 1982). Zur Ermittlung der Reifedaten wurde jede Pflanze 3 mal pro Jahr durch Vergleich mit standardisierten Kartoffelsorten mit einer Skala von 1 bis 9 (frühreif bis spätreif) bonitiert. Diese Bonituren wurden in den Jahren 1999, 2000 und 2001 durchgeführt.



**Abb. 2-4: Versuchsanordnung der Feldversuche zur Ermittlung der phänotypischen Resistenzdaten.** Der Versuch wurde als randomisierte Blockanlage mit zwei Wiederholungen von je vier Pflanzen eines Genotyps in einer Reihe angelegt. Die zu evaluierenden Pflanzen waren von Mantelpflanzen, einer Sorte mit mittlerer Anfälligkeit, umgeben. Um eine natürliche Infektion zu simulieren, wurden einige Mantelpflanzen künstlich mit *P. infestans* infiziert, und von diesen Infektionsherden ging die Infektion in die Prüfpflanzen über.

## 2.6.2. Genotypisierungsdaten

Die Genotypisierungsdaten wurden mit geeigneten Methoden (Kap. 2.5.) unter Berücksichtigung der exakten Allelverhältnisse erhoben.

**Zusammenstellung von Vergleichsgruppen (*cases* und *controls*).** Aufgrund von phänotypischen Evaluierungsdaten des Jahres 2001 bezüglich der Resistenz wurden aus beiden F1-Populationen Individuen mit extremen Resistenzmerkmalen selektiert. Aus der Kreuzung Nikita x Leyla wurden 14 hoch resistente und 20 hoch anfällige Pflanzen ausgewählt. Ergänzend wurden aus der Kreuzung Escort x Leyla 14 hoch resistente und 1 hoch anfällige Pflanzen genutzt.

Die Genotypisierungsdaten wurden zunächst in den *cases* und *controls* erhoben. Zur genaueren Untersuchung einiger Polymorphismen wurden alle Individuen der F1-Generationen genotypisiert.

## 2.6.3. Statistische Auswertungen

Die statistischen Auswertungen erfolgten mit den Programmpaketen SPSS 10.0.7 (SPSS für Windows, 1989-1992) und SAS 8.00 (SAS Institute, Inc., 1990).

### **Bearbeitung der phänotypischen Daten:**

AUDPC-Resistenzwert: Mit den erhobenen Boniturwerten zur Resistenz wurden AUDPC-Werte (*Area under disease progress curve*) mit folgender Formel berechnet (Jeger und

Viljanen-Rollinson, 2001): 
$$\sum_{i=1}^n \left[ \left( \frac{x_i + x_{i+1}}{2} \right) \times (t_{i+1} - t_i) \right]$$
 ( $x_i$  = Boniturwert (1 bis 9) bei Messung  $i$ ,  $t_i$  = i-ter Tag der Messung  $i$ ,  $n$  = Anzahl Messungen)

Reifewerte: Die Daten zur Reifezeit wurden direkt zur statistischen Auswertung herangezogen.

Reifekorrigierte Resistenzwerte: Es wurde eine Regressionsgerade zwischen den AUDPC-Resistenzdaten und den Reifedaten berechnet. Die reifekorrigierten Resistenzdaten ergaben sich durch die Differenz zwischen den AUDPC-Werten und der Kurve.

Die phänotypischen Daten wurden in allen Versuchspopulationen mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstests auf Normalverteilung getestet. Dabei wurde eine Normalverteilung ab  $P \leq 0,20$  angenommen.

### **Bearbeitung der Genotypisierungsdaten:**

Als Primärdaten des Genotypisierens wurden die individuellen Allelkompositionen für jeden Polymorphismus unter Berücksichtigung der Tetraploidie aufgenommen. Diese konkreten Allelkompositionen wurden in Zahlen umgeschrieben, indem jeweils die Anzahl eines der

Allele gezählt wurde (z.B.: CCCC=4, CCCT=3, CCTT=2, CTTT=1, TTTT=0). Dabei wurde die Häufigkeit desjenigen Allels berücksichtigt, welches ausschließlich oder zumindest vermehrt von dem resistenten Elter stammte (z.B.: Nikita: CCTT=2, Leyla: TTTT=0)

Bei den Polymorphismen, welche in der F1-Generation mit mehr als zwei verschiedenen Allelverhältnissen auftraten, wurden zusätzlich für genauere Analysen mehrere Allelverhältnisse zu Gruppen zusammengefasst. Dies sei an folgendem Beispiel erläutert: Bei den Allelkompositionen TTTT=0 x CCTT=2 in den Eltern treten in der F1-Generation die Allelverhältnisse TTTT=0, CTTT=1 und CCTT=2, auf. Neben der gesonderten Betrachtung aller Genotypen gegeneinander (TTTT=0 <-> CTTT=1 <-> CCTT=2) ist es möglich, jeweils zwei Gruppen zusammenzufassen und diese Gemeinschaftsgruppe gegen die dritte Gruppe zu vergleichen. Entsprechend können die Genotypen mit dem C-Allel, unabhängig von der Häufigkeit dieses Allels (CTTT=1 und CCTT=2), zusammengefasst werden und im Vergleich mit dem Genotyp TTTT=0 analysiert werden. Alternativ können auch die Gruppen TTTT=0 und CTTT=1 addiert und gegen CCTT=2 gestellt werden.

### **Korrelationsanalysen:**

Bei den Korrelationsanalysen wurden die beiden Populationen zunächst getrennt analysiert. Mit den Polymorphismen, bei welchen die Eltern der beiden Populationen die exakt gleichen Allelkompositionen aufwiesen, wurden zusätzlich die kombinierten Populationen untersucht. Korrelationen wurden für alle Polymorphismen mit allen phänotypischen Datenreihen untersucht. Bei phänotypischen Daten, welche eine Normalverteilung zeigten, wurde ein parametrischer Test zur Korrelationsanalyse (eindirektionelle ANOVA) durchgeführt. Bei nicht-normalverteilten phänotypischen Daten wurden bei zwei Genotypklassen der Mann-Whitney-U-Test und bei mehr als zwei Genotypklassen der Kruskal-Wallis-Tests genutzt. Die  $R^2$ -Wert wurden mit ANOVA-Analysen ermittelt. Dieser Wert zeigt den Anteil an der gesamten Varianz, welcher von dem untersuchten Polymorphismus erklärt wird.

Eine Kopplung des Polymorphismus mit dem Merkmal wurde ab einem  $P$ -Wert von  $P \leq 0,05$  als signifikant eingestuft.

### **Regressionsanalysen:**

Alle Polymorphismen, welche signifikante Effekte bei den Korrelationsanalysen zeigten, wurden in einer multiplen Regressionsanalyse genutzt (SAS-Programm: procedure PROC REG, option SELECTION = FORWARD,  $P \leq 0,05$ ).

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Identifizierung und Analyse von SNPs in RGL-Kandidatenregionen

Ein wichtiges Ziel dieser Arbeit bestand in der Identifizierung und Analyse von SNPs und Indels in RGL-Kandidatenregionen. Hierdurch sollten einerseits Erkenntnisse über die Variabilität des Kartoffelgenoms gewonnen werden, andererseits sollte aufbauend auf diesen Ergebnissen die QTL-Analyse (Kap. 3.3.) durchgeführt werden.

##### 3.1.1. Identifizierung von RGL-Kandidatenregionen

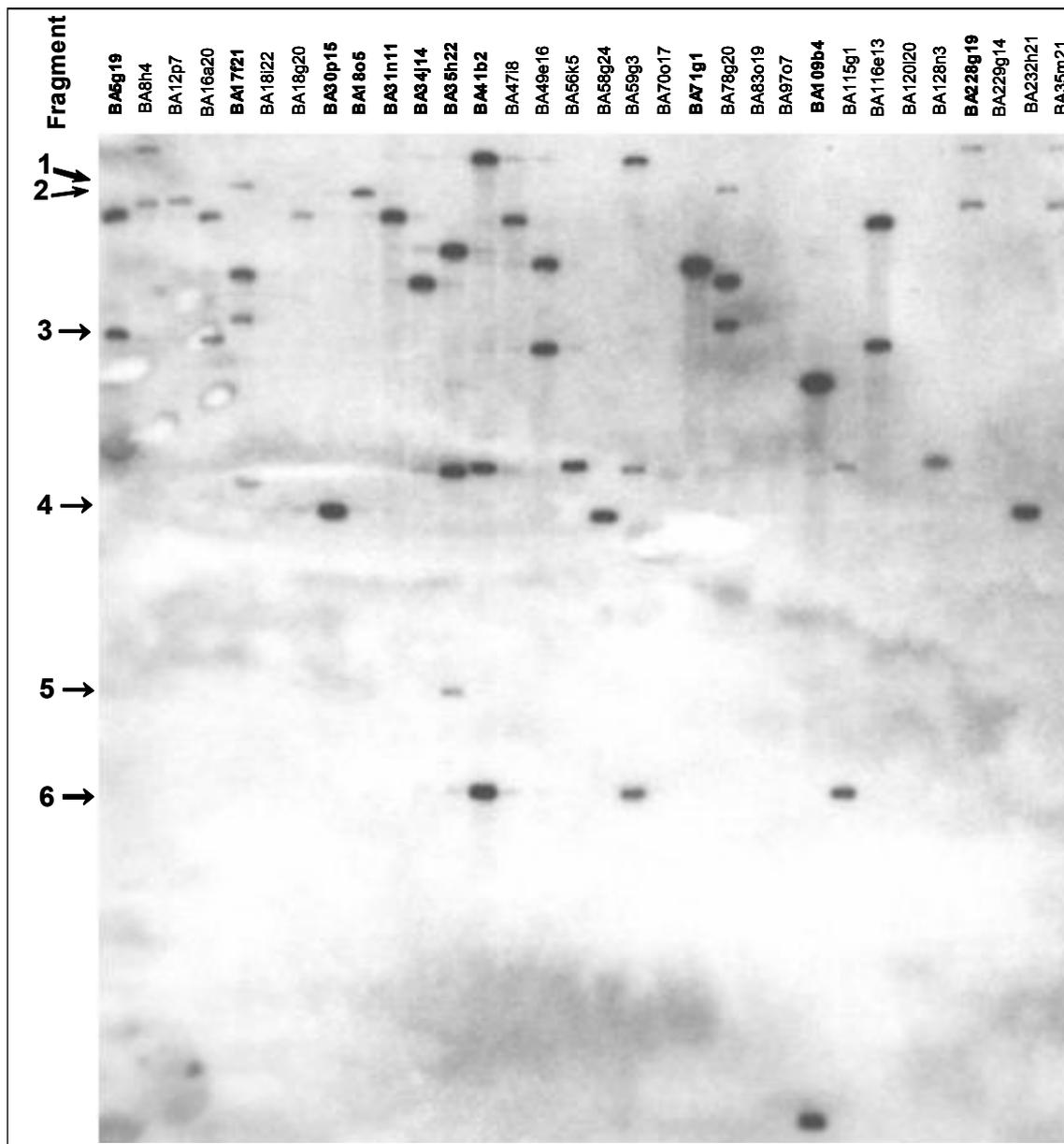
**Screening der BAC-Bibliothek.** Um RGL-Kandidatenregionen zu identifizieren, wurde die BAC-Bibliothek mit fünf verschiedenen Sonden durchmustert. Da die verwendeten Sonden Sequenzhomologien zu Motiven von bekannten Resistenzgenen (siehe Kap. 1.6.1.; Tab. 2-1) aufwiesen, konnten so in der Bibliothek BAC-Klone mit RGLs identifiziert werden. Insgesamt wurden 230 positive Klone detektiert (Übersicht in Tab. 3-1; gesamte Auflistung der Klone in Tab. 9-10).

Tab. 3-1: Zusammenfassung der identifizierten BAC-Klone mit RGLs.

Sonde:	Anzahl positiver Klone:	Kartierungspositionen der Insertionen:
<i>RGL-BA121o1</i>	21	V
<i>RGL-BA47f2</i>	33	I, IV, V, VI, VIII
<i>St.1.2.1</i>	65	XI
<i>St.1.2.4</i>	76	I, II, V, X, XII
<i>St.3.3.13</i>	34	VI, XI

**Kartierung von BAC-Insertionen.** Von den BAC-Klonen wurden zunächst RFLP-*Fingerprints* angefertigt (Kap. 2.4.1.2.). Diese dienten zum einen dazu, redundante Klone auszuschließen und zum anderen konnten so, zumindest teilweise, die identifizierten Insertionen kartiert werden. Dazu wurden die durch *TaqI*- bzw. *MseI*-Verdau erhaltenen Restriktionsfragmente mit Kartierungsergebnissen von RFLP-Analysen verglichen, welche mit den gleichen Sonden und den gleichen Enzymen in der Kartierungspopulation F18x40 (siehe Kap. 2.4.2.1.) durchgeführt worden waren (Ch. Gebhardt, unveröffentlichte Daten; Leister *et al.*, 1996). Da der Elter P40 der Kartierungspopulation zu 50% an der BAC-Bibliothek beteiligt ist, konnten kartierte RFLPs BACs mit den gleichen Fragmenten

zugeordnet werden. In Abbildung 3-1 ist beispielsweise die RFLP-Analyse der positiven Klone aus dem *Screening* mit der Sonde *St.3.3.13* gezeigt.



**Abb. 3-1: RFLP-Analyse der positiven BAC-Klone aus dem *Screening* mit der Sonde *St.3.3.13*.** Es ist die *Southern-Gel-Blot*-Analyse der *TaqI*-verdauten DNAs der BAC-Klone nach der Hybridisierung mit der Sonde *St.3.3.13* zu sehen. Die links angegebenen Fragmente kartieren auf folgende Chromosomen: 1 = KG VI, 2 = KG XI, 3 = KG VI, 4 = KG XI, 5 = KG XI und 6 = KG VI. Eine zusätzliche Bestätigung der Kartierungsergebnisse war möglich, da der Klon BA35h22, hier über Bande 5 auf Kopplungsgruppe XI kartiert, das Gen NI-27 beinhaltet (siehe Sequenz T3-Ende in Tab. 9-11) und dieses auf Chromosom XI (Hehl *et al.*, 1998) liegt. Fett dargestellte BAC-Klone wurden für die weiterführenden Schritte zur Identifizierung von SNPs und Indels in RGL-Kandidatenregionen (Kap. 3.2.1.) ausgewählt.

Da nicht alle identifizierten BAC-Klone über die RFLP-Analysen kartiert werden konnten und um die Kartierungsergebnisse der RFLP-Analysen zu verifizieren, wurden einige BAC-Insertionen mit Hilfe von SNPs bzw. Indels (Kap. 3.1.2.) kartiert. Dazu wurden auf Basis der in verschiedenen Kartoffellinien identifizierten SNPs/Indels (Kap. 3.1.2.) gezielt Marker ausgewählt, die in verfügbaren Kartierungspopulationen (Kap. 2.4.2.1.) segregieren

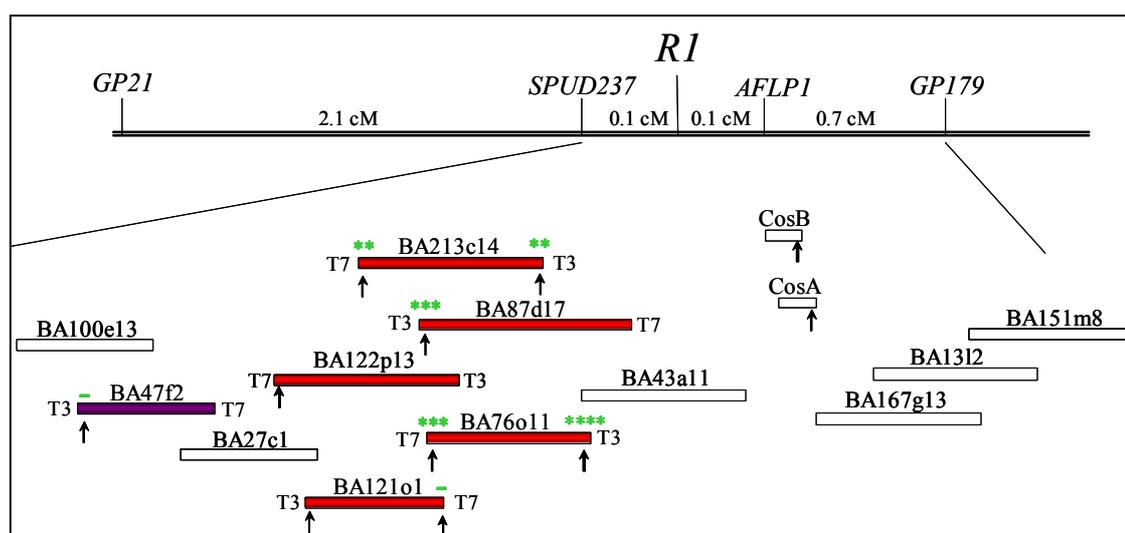
konnten. Die in den Populationen erhobenen Segregationsdaten wurden zur Kartierung mit dem Programm MAPRF (Ritter *et al.*, 1990) analysiert. In der Tabelle 3-2 sind die erfolgreich kartierten BAC-Insertionen, der jeweils genutzte Polymorphismus, die verwendete Kartierungspopulation, die angewandte Genotypisierungsmethode und das Kartierungsergebnis aufgelistet.

Wie der Abbildung 3-3 zu entnehmen ist, konnten RGLs, welche in BAC-Insertionen enthalten sind, auf allen Kopplungsgruppen - mit Ausnahme der Chromosomen III und IX - kartiert werden.

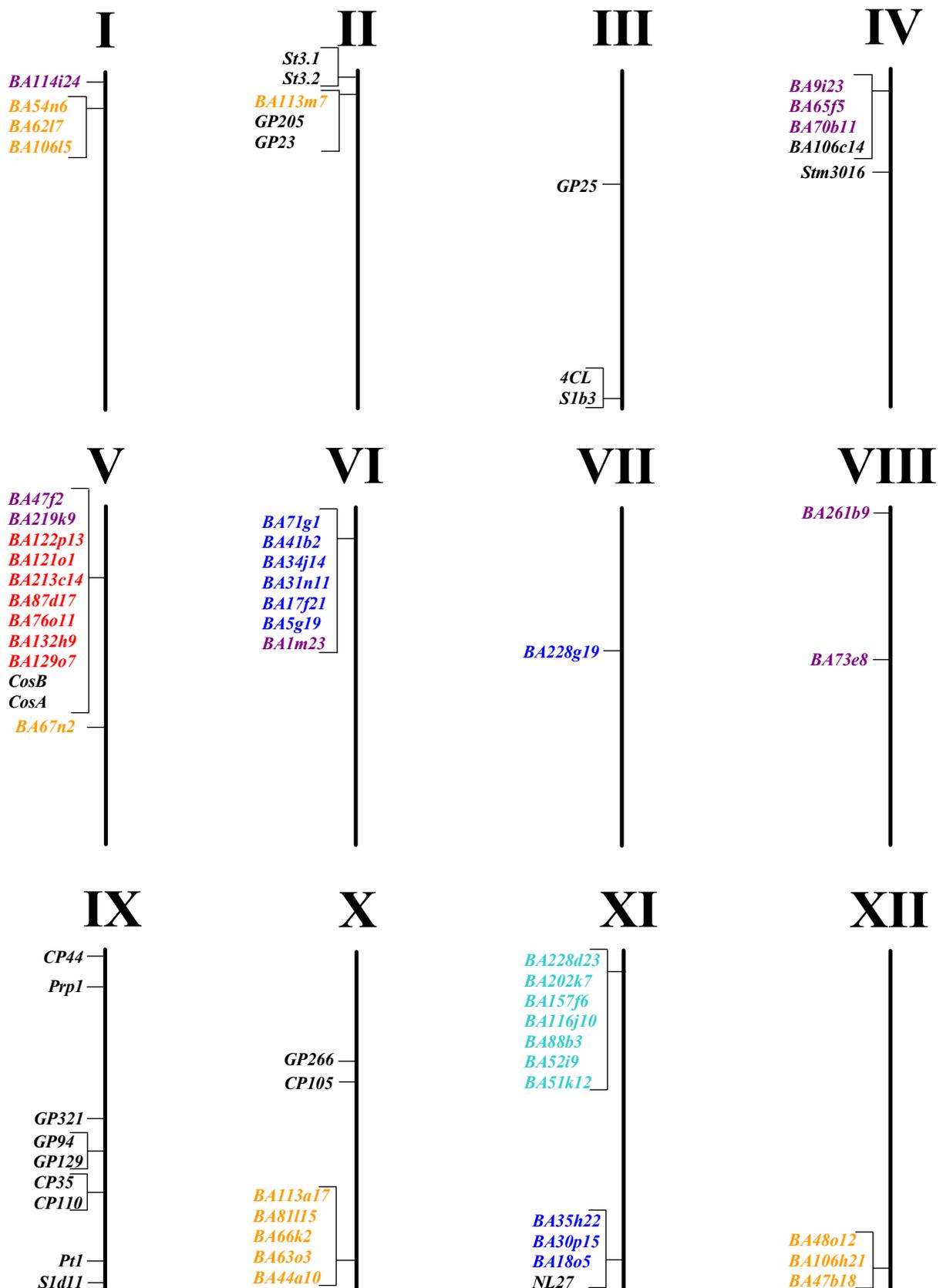
**Tab. 3-2: BAC-Insertionen, welche über SNPs bzw. Indels kartiert wurden.** \* Die verwendeten Oligonukleotide können, abhängig von der gewählten Methode, den Tabellen 9-1, 9-2 und 9-3 im Anhang entnommen werden.

BAC-Insertion	Polymorphismus	Population	Methode*	Chromosom
BA81i15	BA81i15T3_SNP-218	DG81xDG83	Pyrosequencing	X
BA228g19	BA228g19T7_SNP-65	18x40 (F1840)	Pyrosequencing	VII
BA261b9	BA261b9T7_SNP-174	18x40 (F1840)	Pyrosequencing	VIII
BA73e8	BA73e8T3_SNP-65	18x40 (F1840)	Pyrosequencing	VIII
BA228d23	BA228d23T3_SNP-174	3x38 (K31)	Pyrosequencing	XI
BA70b11	BA70b11T7_SNP-334	18x40 (F1840)	SNuPE + DHPLC	IV
BA114i24	BA114i24T3_Indel-94	18x40 (F1840)	SNuPE + DHPLC	I
BA1m23	BA1m23_SNP-88,90,94	18x40 (F1840)	allelspezifische PCR	VI

Einige BAC-Klone aus dem *Screen RGL-BA121o1* waren in einem Contig, welches sich in der *hot spot*-Region auf Chromosom V (Kap. 1.3.) befindet, enthalten (Abb. 3-2; Ballvora *et al.*, 2002).



**Abb. 3-2: Genetische und physikalische Karte der *hot spot* Region für Resistenzen auf Chromosom V** (verändert nach Ballvora *et al.*, 2002). Die BAC-Klone aus dem *Screening* mit der Sonde *RGL-BA121o1* sind in Rot und die aus dem *Screening* mit der Sonde *RGL-BA47f2* in Violett dargestellt. Die Klon-Enden, auf deren Basis erfolgreich SNPs/Indels detektiert werden konnten, sind mit einem Pfeil markiert. Im Rahmen der QTL-Analyse (siehe 3.3.4.) erfolgreich untersuchte Regionen sind mit Signifikanz-Symbolen gekennzeichnet. Die dabei ermittelten Signifikanzen bei dem Merkmal der reifekorrigierten Resistenz (2000 + 2001) sind gemäß folgenden Signifikanzniveaus angegeben: - =  $P \geq 0,05$ ; \* =  $P < 0,05$ ; \*\* =  $P < 0,01$ ; \*\*\* =  $P < 0,001$ ; \*\*\*\* =  $P < 0,0001$



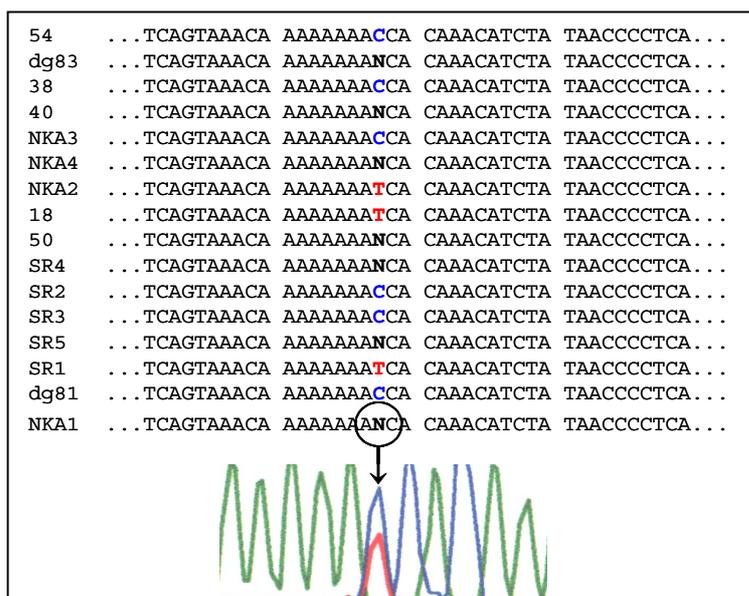
**Abb. 3-3: Karte des Kartoffelgenoms mit identifizierten RGL-Loci und Loci mit SNP-Informationen.** Es sind die Regionen dargestellt, welche durch Screenings mit den Sonden **RGL-BA121o1**, **RGL-BA47f2**, **St.1.2.1**, **St.1.2.4** und **St.3.3.13** detektiert worden sind. In diesen Regionen, als auch in den eingetragenen Loci von bereits bekannten Markern, konnten SNPs/Indels identifiziert werden. BA = BAC-Klone; Cos = Cosmid-Klone; GP, CP = anonyme Marker; St = RGL-Marker

### 3.1.2. SNPs und Indels in RGL-Kandidatenregionen

Primär wurden nun solche BACs bei der Identifizierung von Polymorphismen verwendet, die aufgrund ihrer Kartierungspositionen in der Nähe von bekannten QTLs und *R*-Genen kartierten. Um aber die Möglichkeit zur Identifizierung ganz neuer QTLs zu wahren, wurden auch andere Regionen berücksichtigt.

Insgesamt wurden 117 BAC-Enden ansequenziert. Datenbankanalysen (BlastN) dieser Sequenzen ergaben für 71 Regionen (61%) keine signifikanten Homologien zu Sequenzen in der Datenbank, 46 BAC-Endsequenzen (39%) wiesen Übereinstimmungen mit bekannten Genen auf. Von diesen zeigten 22 Regionen (19%) Homologien mit Resistenzgenen (Tab. 9-11; Homologien ab 100bp langen Übereinstimmungen und einem e-Wert kleiner  $10^{-10}$  als signifikant angenommen).

**Identifizierung von SNPs und Indels.** Zur Identifizierung von Polymorphismen in den ausgewählten Regionen wurden zunächst spezifische Primer (Tab. 9-1) auf der Basis der BAC-Endsequenzen entworfen. Mit diesen Primern wurden dann die 200 bis 700bp großen



**Abb. 3-4: Beispiel zur Identifizierung eines SNPs über die Analyse des Alignments und von Elektropherogrammen.** Gezeigt ist ein Ausschnitt des Alignments um den T-C-SNP BA261b9/154 und der passende Elektropherogrammabschnitt eines heterozygoten Genotyps.

Fragmente jeweils in 17 tetraploiden und 11 diploiden Kartoffellinien (Kap. 2.4.2.1.) amplifiziert und sequenziert. Die Sequenzen wurden *aligned* und die Elektropherogramme manuell analysiert (Bsp. siehe Abb. 3-3). Die manuelle Auswertung erwies sich insbesondere zur Bestimmung der konkreten Allelverhältnisse bei den tetraploiden Genotypen (siehe auch Kap. 3.2.1.) und zur Analyse der Indels als erforderlich.

51 Regionen (44%) konnten nicht eindeutig ausgewertet werden, da die Sequenzen schlechte bzw. überlappende Signale aufwiesen. Bei den nicht analysierbaren Fragmenten zeigten die meisten entweder keine Homologien zu bekannten Genen (31 = 61%) oder Übereinstimmungen mit Resistenzgenen (14 = 27%). Insgesamt 65 Regionen (56%) mit einer Länge von 28402 bp konnten erfolgreich analysiert werden und es wurden 1123 SNPs und 83 Indels identifiziert (Tab. 9-11).

Ergänzend zu den Polymorphismen, welche auf der Basis von BAC-Klonen mit RGLs identifiziert werden konnten, werden im Folgenden auch allelische Variationen berücksichtigt, welche auf der Basis bereits bekannter Markersequenzen (Gebhardt *et al.*, 2001; Abb. 1-3) aus Pathogenresistenz vermittelnden Regionen in dem gleichen Genpool mit analoger Vorgehensweise detektiert wurden. Diese Daten waren größtenteils von Jeong Hee Kim erhoben worden (unveröffentlichte Daten; Tab. 9-1, Tab. 9-12). Insgesamt wurden 21 Fragmente mit einer Gesamtlänge von 12436 bp analysiert und hierbei 416 SNPs und 51 Indels identifiziert.

**Variabilität des Genpools.** Die beiden Datensätze zusammenfassend wurden also insgesamt 40838 bp in einem Genpool von 28 Genotypen vergleichend analysiert. Dabei wurden 1539 SNPs und 134 Indels detektiert. Dies ergibt eine Frequenz von 1 SNP in 27 Basen und 1 Indel in 305 Basen. Hierbei ist eine größere Variabilität, insbesondere bei Indels, in den Regionen festzustellen, welche keine Homologie zu bekannten Genen haben (1SNP/25bp, 1Indel/240bp) im Vergleich zu den Regionen mit signifikanter Homologie zu kodierenden Regionen (1SNP/29bp, 1Indel/432bp) (Tab. 3-3). Ein Vergleich der SNPs innerhalb der Gruppe der diploiden Genotypen mit denen innerhalb der tetraploiden Genotypen zeigt, dass bei den diploiden Genotypen SNPs mit einer größeren Häufigkeit detektiert wurden (Tab. 3-4).

Da die SNP-Frequenz unmittelbar von der Anzahl der untersuchten Genotypen abhängt, wurde zur Abschätzung der Variabilität des Genpools die Nukleotid-Diversität  $\pi$  (Nei, 1987; Li und Sadler, 1991; Li, 1997) berechnet.  $\pi$  ist die Anzahl der Nukleotidunterschiede zwischen zwei beliebigen homologen Sequenzen einer Population. Tabelle 3-4 ist zu entnehmen, dass in dem Genpool der diploiden Genotypen eine höhere Diversität vorhanden ist als bei den tetraploiden Genotypen. Insgesamt liegt die Nukleotid-Diversität bei  $7,4 \times 10^{-4}$ .

**Tab. 3-3: Übersicht über die insgesamt identifizierten SNPs und Indels, aufgeschlüsselt nach Regionen ohne Homologien zu bekannten Genen und mit Homologien zu Genen bzw. RGLs.** Die Frequenzen beziehen sich auf jeweils 1 SNP bzw. Indel pro Anzahl bp.

	Anzahl der Regionen	Länge [bp]	SNPs		Indels	
			Anzahl	Frequenz	Anzahl	Frequenz
Homologien zu Genen	32	19457	672	1/29	45	1/432
RGLs	11	5145	205	1/25	12	1/429
keine Homologien	49	21381	867	1/25	89	1/240
insgesamt	81	40838	1539	1/27	134	1/305

**Tab. 3-4: Analyse der SNP-Diversität in di- und tetraploiden Genotypen.**

Untersuchungspopulation (N)	SNP-Frequenz	Nukleotid-Diversität $\pi$
diploid Genotypen (11)	1/32	$2,31 \times 10^{-3}$
tetraploid Genotypen (17)	1/42	$0,72 \times 10^{-3}$
diploid und tetraploide Genotypen (28)	1/27	$0,74 \times 10^{-3}$

**Substitutionstypen.** Bei der Analyse der SNPs wurden insgesamt 54 tri-allele und 5 tetra-allele Positionen identifiziert. Eine Differenzierung der SNPs bezüglich der zugrundeliegenden Substitutionstypen zeigte, dass mehr Transitionen als Transversionen auftraten. Das Verhältnis zwischen den beiden Substitutionstypen lag bei durchschnittlich 1,51 (Ti/Tv) (Tab. 3-5).

**Tab. 3-5: Analyse der Substitutionstypen.** Die Substitutionstypen sind nach dem *IUB ambiguity code* (Kap. 8) angegeben.

	Transition (Ti)			Transversion (Tv)					Ti/Tv	B	V	H	D	N
	Y	R	insg.	K	M	S	W	insg.						
dipl.	384	363	747	133	115	71	161	480	1,55	5	5	7	14	3
tetrapl.	286	267	553	104	81	58	138	381	1,45	7	3	6	12	3
insg.	443	419	862	160	131	81	196	568	1,51	10	8	14	22	5

**Heterozygotiegrad.** Alle SNPs und Indels wurden daraufhin untersucht, ob sie in den Genotypen homo- oder heterozygot vorlagen. Hierbei zeigte sich, dass homozygote Allelzustände grundsätzlich häufiger auftreten als heterozygote Kompositionen. Dieses Verhältnis zugunsten der homozygoten Genotypen ist bei den Indels stärker ausgeprägt als bei den SNPs (Tab. 3-6). Auffällig ist, dass bei den tetraploiden Genotypen der Anteil an heterozygoten Allelzuständen deutlich größer ist als bei den diploiden Genotypen (Tab. 3-6).

**Tab. 3-6: Analyse des Heterozygotiegrads bei SNPs und Indels.**

	SNPs			Indels		
	homozygot	heterozygot	hom./het.	homozygot	heterozygot	hom./het.
diploid	8035	1394	5,8	636	84	7,6
tetraploid	10776	3662	2,9	784	205	3,8
insgesamt	19903	5056	3,9	1502	289	5,2

**Dokumentation der SNPs und Indels.** Alle identifizierten Polymorphismen sind in Zusammenarbeit mit Svenja Meyer und Axel Nagel vom Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH (Berlin) in einer Oracle-Datenbank dokumentiert worden (Bsp. Abb. 3-5). Diese Daten können auf folgenden Internetseiten abgerufen werden:

<http://gabi.rzpd.de> → Database auswählen → Greencards auswählen.

**(a) GreenCards**

**Sample: 202-B23-T3\_NKA1**

**Genotype:**  
 species: *Solanum tuberosum* (potato)  
 cultivar: nka1  
 ploidie: tetraploid

**Sequence: 202-b23-T3\_NKA1**  
 Submitter of sequence: [Herr Andreas M. Rickert](#)

202-b23-T3\_NKA1

ATGGGCGACA	CACGGAGGAA	TACCCGATCA	CCAACAGAGA	ATCTCAAAGG	TCGACGCCTC	60
TGATCAGCAT	AACTCTGGTG	CCTACTCTGA	GCCGTCTCTGA	GCCTATCCTG	AATCACCCCTC	120
ACCTGATCCA	GGCCCTCCTG	AAGCAAATCT	GACCACGCG	GCCTAGGCTC	TGTAGACTCA	180
AACCAACCAA	CTGGAGAGCG	ACAACGCTA	CCATATAAGG	CCTCAAACGG	GGCCATCTGA	240
ATACTAGAGT	GGTAGCTGTT	GTTGTACCCA	AACTCCGCCA	AAGGCAAAA	CTGGTCCCAC	300
TGACCTCCAA	AATCCATAAC	ACAGGCCCGC	AACATATCCT	CAAGGACCTG	AATAGTACGC	360
TCTGACTGAC	CATCCGTCTG	TGGGTGAAAT	GCTGTGCTAA	GGTGGACACG	GGTGCCCAAC	420
TCCTCTGAA	AAGCCCTCCA	AAAGCTGGAA	GTGAA			455

**SNP: left flanking [allele] right flanking**

- ▶ [SNP147](#): CCTGAAGCAA [A/A/A/A] TCTGAACCAC
- [SNP152](#): AGCAAATCTG [A/T/T/T] ACCACGCGGC
- [SNP225](#): ATAAGGCCTC [A/A/A/A] AACGGGGCCA
- [SNP228](#): AGGCCTCAAA [c/c/c/c] GGGGCCATCT
- [SNP276](#): ACGCAAATCT [c/c/c/T] GCCAAAGGCA
- [SNP288](#): CCAAAGGCAA [A/g/g/g] AACTGGTCCC

**(b)**

SNP: SNP147

strain	left flanking [allele]	right flanking	sequence origin
18:	CCTGAAGCAA [A/A]	TCTGTACCAC	<a href="#">202-B23-T3 18</a>
3:	CCTGAAGCAA [A/A]	TCTGAACCAC	<a href="#">202-B23-T3 3</a>
38:	CCTGAAGCAA [A/A]	TCTGTACCAC	<a href="#">202-B23-T3 38</a>
40:	CCTGAAGCAA [A/A]	TCTGAACCAC	<a href="#">202-B23-T3 40</a>
50:	CCTGAAGCAA [A/A]	TCTGTACCAC	<a href="#">202-B23-T3 50</a>
54:	CCTGAAGCAA [A/A]	TCTGAACCAC	<a href="#">202-B23-T3 54</a>
DG81:	CCTGAAGCAA [A/A]	TCTGAACCAC	<a href="#">202-B23-T3 DG81</a>
DG83:	CCTGAAGCAA [A/A]	TCTGTACCAC	<a href="#">202-B23-T3 DG83</a>
E:	CCTGAAGCAA [A/A/A/G]	TCTGAACCAC	<a href="#">202-B23-T3 E</a>

**Abb. 3-5: Beispiel für die Dokumentation der SNPs und Indels.** (a) Gezeigt ist eine SNP-Dokumentation (= GreenCard) des Locus 202B23T3 für den Genotyp NKA1. In einer GreenCard ist die Sequenz des Locus aufgeführt; hierbei sind die in dem Genpool identifizierten polymorphen Positionen blau hervorgehoben. Für den jeweils in der GreenCard ausgewiesenen Genotyp sind die exakten Allelkompositionen der SNPs (und Indels) unter Berücksichtigung des Polyploidiegrads mit Positionsbezeichnungen und umgebenden Basen unterhalb der vollständigen Sequenz aufgelistet. (b) Von der GreenCard aus können für jeden einzelnen SNP (und Indel) die Allelkompositionen in allen anderen analysierten Genotypen aufgerufen werden. Hier ist ein Ausschnitt der Liste für den SNP147 (schwarze Pfeile) gezeigt.

## 3.2. Methoden zum quantitativen Genotypisieren von Polymorphismen in polyploiden Organismen

Eines der drei vorrangigen Ziele dieser Arbeit war die Evaluierung und Optimierung von Methoden zum quantitativen Genotypisieren von Polymorphismen in polyploiden Organismen. In diesem Abschnitt werden nun Ergebnisse präsentiert, die relevant für diese technisch-methodische Fragestellung sind. Die auf der Grundlage der methodischen Erkenntnisse erhobenen Genotypisierungsergebnisse werden dann in dem Kapitel zur QTL-Analyse (Kap. 3.3.) vorgestellt.

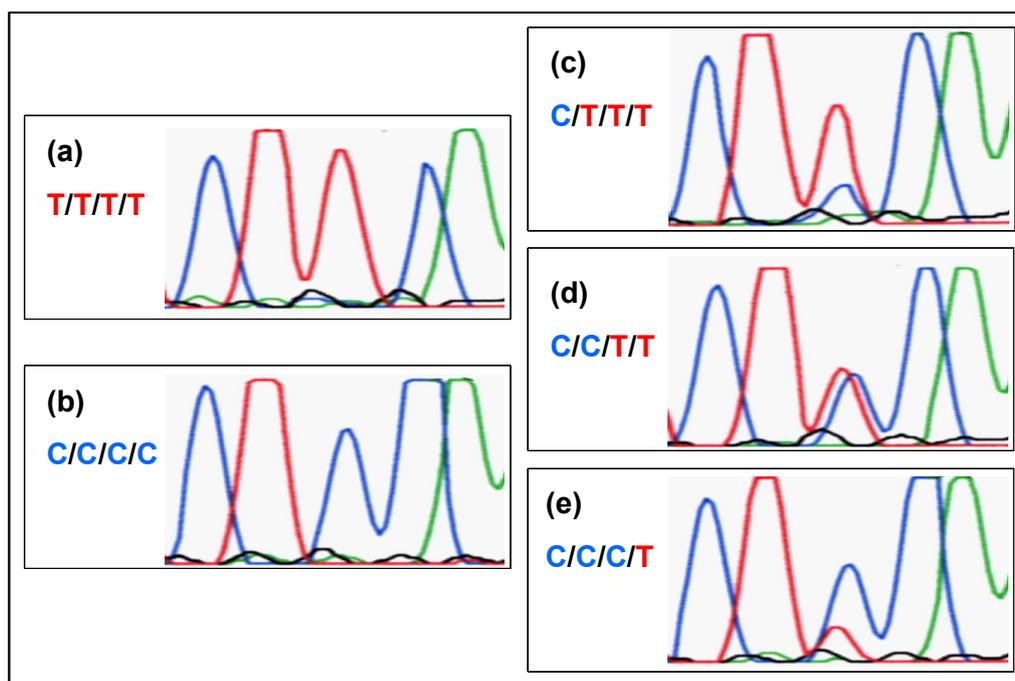
### 3.2.1. *BigDye-Sequencing*

**Eignung zum Genotypisieren in tetraploiden Organismen.** Für die QTL-Analysen wurden insgesamt sechs SNPs (BA44a10T7/114, BA228g19T7/70, NL27/335, NL27/355, NL27/417, GP23/271) mit dieser Methode untersucht und erfolgreich quantitativ genotypisiert (Tab. 3-10, Tab. 3-11 am Ende des Kapitels 3.2.1.).

In Abbildung 3-6 sind beispielsweise die Elektropherogramme um den binären SNP BA44a10T7/114 von allen fünf möglichen Allelverhältnissen zu sehen. Um eine exakte Bestimmung der Allelverteilungen dieses SNP durchzuführen, wurden die Peakhöhen der allelischen Basen in den Elektropherogrammen vermessen. Auf der Basis des bekannten „2-2“-heterozygoten Individuums wurde dann ein Korrekturfaktor  $k$  berechnet und mit diesem dann die anderen Verhältnisse angepasst; die so ermittelten Allelverhältnisse entsprechen einer zu erwartenden Unterscheidung in 25%-Schritten (Tab. 3-7).

**Tab. 3-7: Gemessene und korrigierte Peakhöhen der Elektropherogramme für fünf verschiedenen Genotypen des binären SNP BA44a10/114 (siehe Abb. 3-6).** Bei den gemessenen Peakhöhen handelt es sich um Angaben in cm; die Werte sind allerdings relativ zu verstehen, da sie von der zugrunde liegenden Ausdrucksgröße abhängen. Auf der Basis des bekannten „2-2“-heterozygoten Individuums wurde ein sequenz- und methodenspezifischer Korrekturfaktor  $k$  berechnet und mit diesem die anderen Verhältnisse angepasst.

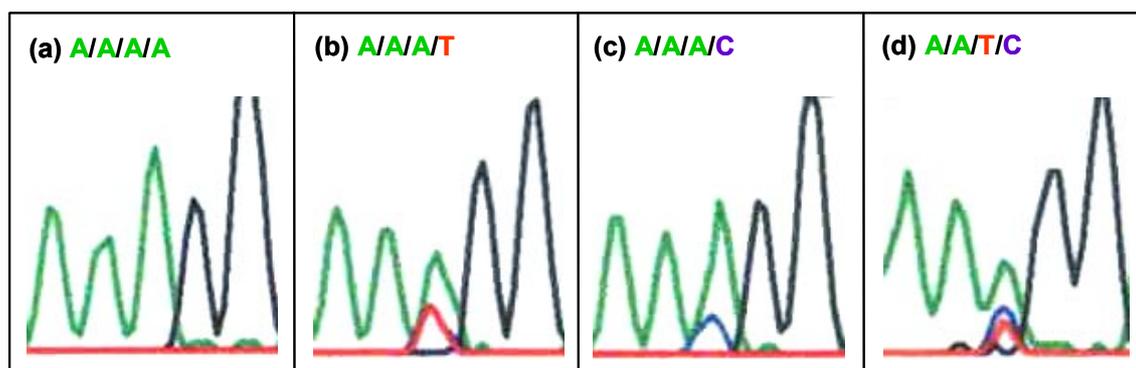
Genotyp	gemessene Peakhöhe		korrigierte Peakhöhe ( $k=1.07$ )		Allelverteilung [%]	
	T	C	T	C	T	C
TTTT	3,3	0	-	-	100	0
TTTC	2,5	0,8	2,5	0,86	74,4	25,6
TTCC	1,6	1,5	1,6	1,6	50	50
TCCC	0,7	2	0,7	2,14	24,6	75,4
CCCC	0	2,8	-	-	0	100



**Abb. 3-6: Genotypisierung des binären SNP BA44a10/114 mit BigDye-Sequencing.** Es sind die Elektropherogramme aller fünf verschiedener Allelkompositionen des T-C-SNPs zu sehen. Die polymorphe Base befindet sich in der mittleren Position des gezeigten Sequenzausschnittes. (a) und (b) zeigen die beiden homozygoten Zustände, in (c), (d) und (e) sind die Genotypisierungsergebnisse der drei heterozygoten Allelverteilungen dargestellt.

Die SNPs BA44a10T7/114 und BA228g19T7/70 wurden vergleichend mit den Methoden *Minisequencing* und *Pyrosequencing* (Kap. 3.2.3. und 3.2.6.) auf der gesamten Populationen der QTL-Analyse genotypisiert. Für jede Gruppe der drei möglichen heterozygoten Genotypen wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen, sowie die Streuungen ermittelt (Tab. 3-11). Grundsätzlich ist eine deutlich höhere Genauigkeit zu erzielen, wenn sowohl der *forward*- als auch der *reverse*-Strang sequenziert und das Allelverhältnis auf Basis beider Werte berechnet wird (Tab. 3-11b). Die durchschnittliche Abweichung lag bei 2,8% mit einer Streuung von 0% bis 10,2%. Somit konnten alle untersuchten Individuen einem der fünf möglichen Allelverhältnissen zugewiesen werden.

**Genotypisierung von tri-allelischen SNPs.** Obwohl es sich bei dem überwiegenden Teil der SNPs um binäre Polymorphismen handelt, gibt es auch tri-allelische SNPs (Kap. 3.1.2.). In einem tetraploiden Organismus wie der Kartoffel können bei solchen SNPs in einem individuellen Genotyp alle drei Allele vorliegen. Somit war es erforderlich zu evaluieren, ob mit *BigDye-Sequencing* eine tri-allelische Genotypisierung möglich ist. Dazu wurden verschiedene Allelkompositionen des T-C-A-SNPs GP23/271 untersucht. Es zeigte sich, dass eine Diskriminierung der verschiedenen Zustände und eine quantitative Genotypisierung auch beim gleichzeitigen Vorhandensein aller drei Nukleotide möglich ist (Abb. 3-7).



**Abb. 3-7: Genotypisierung des tri-allelichen SNP GP23/271 mit BigDye-Sequencing.** Es sind die Elektropherogramme von vier verschiedenen Allelkompositionen des T-C-A-SNPs zu sehen. In (a) ist ein homozygoter Genotyp gezeigt, in (b) und (c) sind Allelkompositionen mit jeweils zwei allelischen Nucleotiden dargestellt, und in (d) ist das Ergebnis eines Genotyps mit allen drei allelischen Basen gezeigt.

**Kosten.** Einen weiteren wichtigen Punkt beim Vergleich zwischen den verschiedenen Genotypisierungsmethoden spielen die Kosten. Diese beliefen sich, inklusiv aller erforderlichen Arbeitsschritte, auf 575 € für die Analyse von 96 Proben (Tab. 3-12 am Ende des Kapitels 3.2.1.).

### 3.2.2. PCR-basierte Genotypisierungsmethoden

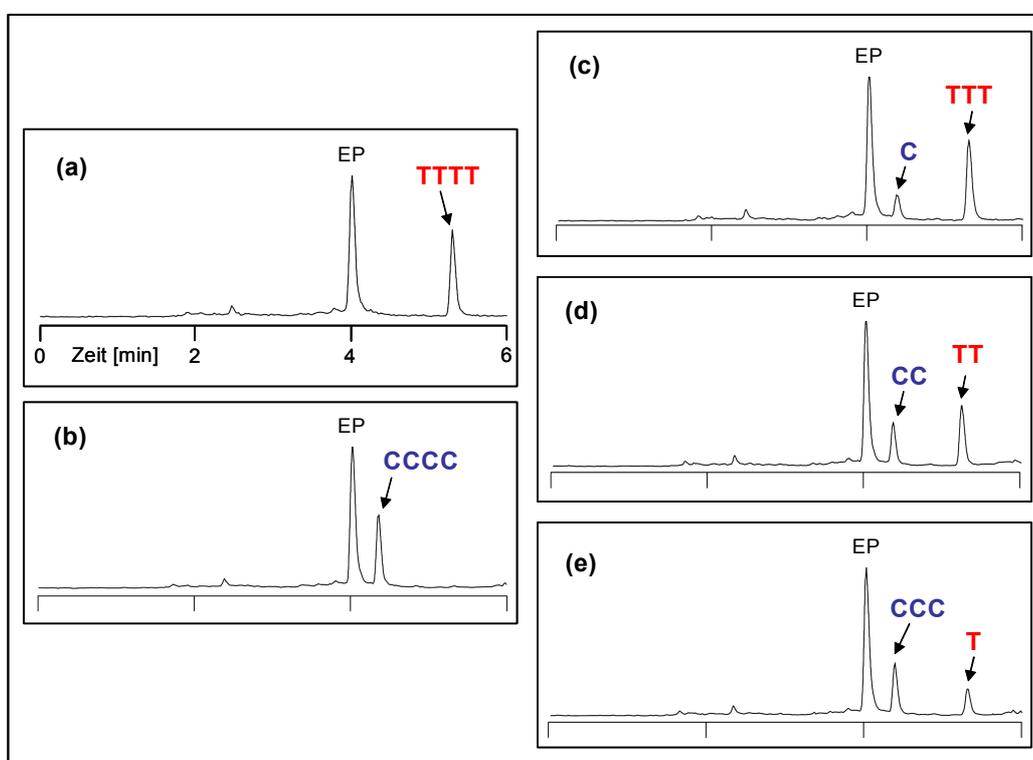
Zum Kartieren der BACs BA1m23 und BA106h21 wurden allelspezifische Primer zur selektiven Amplifikation eines der Allele entworfen (Kap. 2.5.2.). BA1m23 für konnte erfolgreich kartiert werden (Tab. 3-2), beim Locus BA106h21 konnten allerdings keine spezifischen Produkte amplifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Für die QTL-Analyse wurde der DFLP-Marker 213c14T7\_dflp (Abb. 3-30 in Kap. 3.3.3.) untersucht. Obwohl unterschiedliche Bandenstärken im Agarosegel auszumachen sind, war eine Zuordnung zu den theoretisch fünf möglichen Allelverteilungen nicht möglich, so dass lediglich zwischen den beiden homozygoten Genotypen und einem heterozygoten Zustand unterschieden werden konnte. Die Oligonukleotide und die zugrunde liegenden Polymorphismen sind der Tabelle 9-8 zu entnehmen.

**Kosten.** Die Analyse von 96 Proben kostete mit diesen Methoden 75 € (Tab. 3-12).

### 3.2.3. SNUPE in Kombination mit DHPLC (*Minisequencing*)

**Eignung zum Genotypisieren in tetraploiden Organismen.** Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 16 Polymorphismen (15 SNPs, 1 Indel) zum Kartieren (Tab. 3-2) und für die QTL-Analyse (Kap. 3.3.) mit der Methode *Minisequencing* (SNUPE in Kombination DHPLC) untersucht. Die genutzten Oligonukleotide und jeweils spezifisch optimierten Bedingungen können den Tabellen 9-3 und 9-4 entnommen werden. Alle 16 Polymorphismen konnten erfolgreich unter Berücksichtigung der fünf möglichen Allelzustände genotypisiert werden (Tab. 3-10, Tab. 3-11).

In der Abbildung 3-8 sind beispielsweise die Chromatogramme des binären SNP BA44a10T7/114 von allen fünf möglichen Allelverhältnissen zu sehen. Auch bei dieser Methode musste zur exakten Bestimmung der Allelverteilungen ein Korrekturfaktor  $k$  berechnet werden, mit welchem dann die Basenverteilungen in den heterozygoten Individuen angepasst werden konnten (Tab. 3-8). In der Regel geschah die Bestimmung des Korrekturfaktors auf der Basis eines bekannten „2-2“-heterozygoten Individuums. Stand ein solcher „Standard“ nicht zur Verfügung, wurden zwei synthetische Oligonukleotide (Tab. 9-5), welche die beiden allelischen Sequenzen repräsentierten, in einem äquimolaren Verhältnis gemischt und als *Template* in die SNUPE-Reaktion eingesetzt. Die berechneten Korrekturfaktoren variieren zwischen 0,87 und 2,05; wobei auch identische Basenkombinationen bei unterschiedlichen SNPs verschiedene Korrekturfaktoren ausweisen.



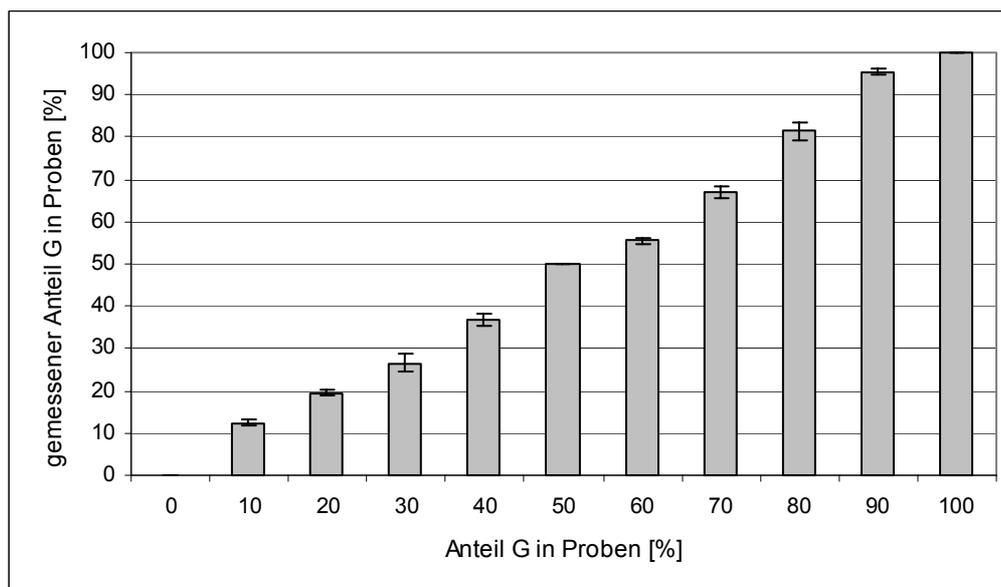
**Abb. 3-8: Genotypisierung des binären SNP BA44a10/114 mit SNUPE in Kombination mit DHPLC.** Es sind die Chromatogramme (Elutionsprofile) aller fünf verschiedener Allelkompositionen des T-C-SNPs zu sehen. (a) und (b) zeigen die beiden homozygoten Zustände, in (c), (d) und (e) sind die Genotypisierungsergebnisse der drei heterozygoten Allelverteilungen dargestellt. Das Fragment wurde mit den Primern 44a10T7\_Fa1 und 44a10T7\_Ra1 amplifiziert, als Extensionsprimer diente 44a10T7\_SNP-114\_expr. Mittels DHPLC wurden die Produkte der SNUPE-Reaktionen aufgetrennt. Die spezifischen Bedingungen der DHPLC sind den Tabellen 9-3 und 9-4 zu entnehmen. Die eluierten Oligonukleotide, unverbrauchte Extensionsprimer (EP) und die Produkte der Extensionsreaktionen (C und T), wurden über UV-Detektion bei 260 nm nachgewiesen.

**Tab. 3-8: Vermessene und korrigierte Peakhöhen der Chromatogramme (Elutionsprofile) für die fünf verschiedenen Genotypen des binären SNP BA44a10/114 (siehe Abb. 3-8).** Bei den gemessenen Peakhöhen handelt es sich um Angaben in cm; die Werte sind allerdings relativ zu verstehen, da sie von der zugrunde liegenden Ausdrucksgröße abhängen. Auf der Basis des bekannten „2-2“-heterozygoten Individuums wurde ein sequenz- und methodenspezifischer Korrekturfaktor  $k$  berechnet und mit diesem die anderen Verhältnisse angepasst.

Genotyp	gemessene Peakhöhe		korrigierte Peakhöhe ( $k=1.37$ )		Allelverteilung [%]	
	T	C	T	C	T	C
TTTT	5,3	0	-	-	100	0
TTTC	5,2	1,9	5,5	2,6	68	32
TTCC	3,6	2,5	3,6	3,6	50	50
TCCC	2,1	4,0	2,1	5,5	28	72
CCCC	0	5,9	-	-	0	100

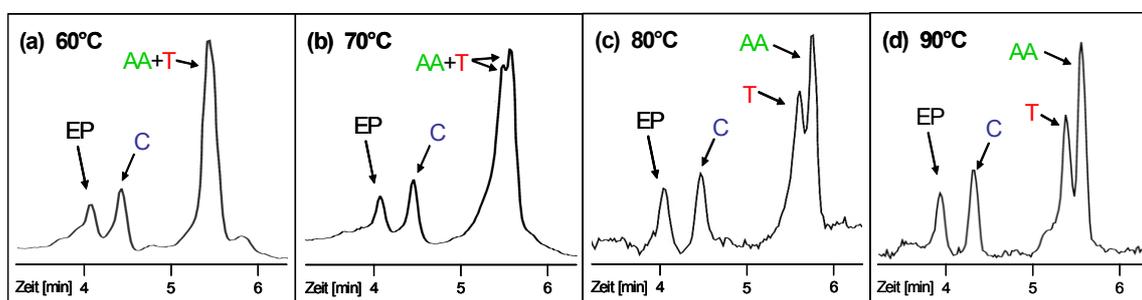
Vergleichend mit den Methoden *BigDye-Sequencing* und *Pyrosequencing* wurden die mit *Minisequencing* erhobenen Genotypisierungsergebnisse der gesamten Untersuchungspopulation für die SNPs BA44a10T7/114 und BA228g19T7/70 statistisch ausgewertet (Tab. 3-11). Die größte gemessene individuelle Abweichung bei einem 3:1-heterozygoten Genotyp (AAAG) lag bei 17%, so dass in diesem Falle eine falsche Einstufung als 2:2-heterozygoter Genotyp vorgenommen wurde. Alle anderen Genotypen konnten korrekt einem der fünf möglichen Allelverhältnissen zugewiesen werden; die durchschnittliche Abweichung lag bei 4,9%.

**Quantitative Genauigkeit.** Zur weiteren Untersuchung der quantitativen Genauigkeit zur Bestimmung von Allelfrequenzen wurden zwei, bezüglich des SNPs BA213c14T3/268 homozygote Genotypen (Leyla = T/T/T/T, 49 = G/G/G/G), deren genomische DNA-Konzentrationen exakt mittels *PicoGreen* bestimmt worden waren, in Verhältnissen von 0% bis 100% in 10%-Abstufungen gemischt und diese Mischproben mit *Minisequencing* genotypisiert (Abb. 3-11). Es ist zu bemerken, dass die zwischen 0% und 5% liegenden Abweichungen nach keinem offensichtlichen Muster auftreten, sondern das jeweils geringere sowohl unter- als auch überschätzt wird. Die gezeigten Ergebnisse wurden mit den in Kapitel 1.5.1.3. beschriebenen Bedingungen erzielt. Sehr ähnliche Werte (Daten nicht gezeigt) wurden auch mit verschiedenen Bedingungen für die SNUPE-Reaktionen erhalten. Dabei wurden in den 20  $\mu$ l Reaktionsansätzen die Menge des Extensions-Primers zwischen 10 und 50 pmol, die Konzentrationen der passenden ddNTPs zwischen 10 und 100  $\mu$ M, das eingesetzte *Template* zwischen 10 und 200 ng und die Zyklenzahl zwischen 10 und 50 variiert.



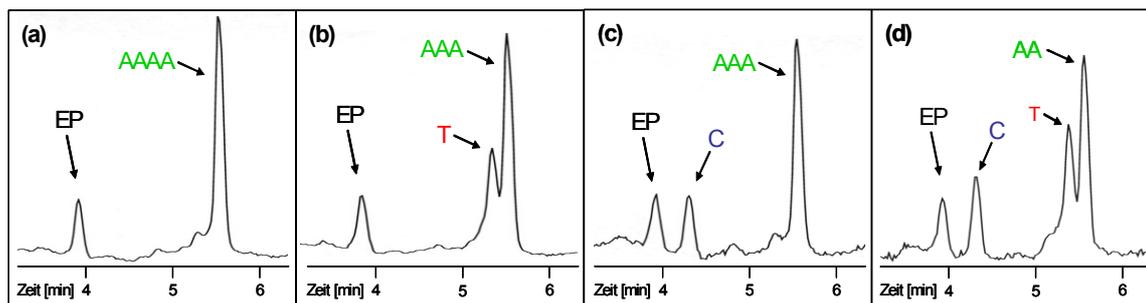
**Abb. 3-9: Analyse der quantitativen Genauigkeit von *Minisequencing* zur Bestimmung von Allelfrequenzen.** Zwei bezüglich des SNPs BA213c14T3/268 homozygote Genotypen (Leyla = T/T/T/T, 49 = G/G/G/G) wurden in Verhältnissen von 0% bis 100% in 10%-Abstufungen gemischt und diese Mischproben mit *Minisequencing* jeweils zweifach genotypisiert. Es sind die gemessenen %-Anteile des Allels G in den Proben gegen die tatsächlich in den Proben vorhandenen %-Anteile des Allels G aufgetragen. Bei den angegebenen Messwerten handelt es sich um korrigierte Werte auf der Basis der Probe mit 50% G (Korrekturfaktor  $k=1,4$ ).

**Optimierung der Trennungseigenschaften.** Bei den Optimierungen der DHPLC-Bedingungen (Tab. 9-4) wurde besonders der Einfluss der Säulentemperatur auf die Trennungseigenschaften deutlich. Insbesondere für die Aufrennung extendierter Oligonukleotide mit ddATP und ddTTP waren hohe Temperaturen erforderlich (Abb. 3-10). Grundsätzlich konnte festgestellt werden, dass die verschiedenen allelischen Extensionsprodukte immer in folgender Reihenfolge eluiert wurden: C, G, T, A.



**Abb. 3-10: Einfluss der Temperatur während der DHPLC auf die Trennung der verschiedenen Oligonukleotide.** Gezeigt sind die Chromatogramme (Elutionsprofile) eines tri-allelischen Genotyps des SNP GP23/271. Das analysierte Fragment wurde mit den Primern GP23\_Fa1 und GP23\_Ra1 amplifiziert und in der SNUPE-Reaktion wurde das Oligonukleotid GP23-SNP\_271\_expr als Extensions-Primer eingesetzt. Zur DHPLC-Analyse der Extensionsprodukte wurden 7  $\mu$ l der Reaktion in eine DNaseq Säule bei (a) 60 °C, (b) 70 °C, (c) 80 °C und (d) 90 °C injiziert. Die Elutionen erfolgten bei konstanter Flussrate von 0,9 ml/min mit folgendem Profil: 23% B in 0,5 min, 23-31% B in 4,5 min, 95% B in 1,5 min, 23% B in 1 min. Die eluierten Oligonukleotide, unverbrauchte Extensionsprimer (EP) und die Produkte der Extensionsreaktionen (C, T und A) wurden über UV-Detektion bei 260 nm nachgewiesen. Es ist zu beobachten, dass mit steigender Temperatur eine exaktere Auftrennung der Extensionsprodukte erfolgte.

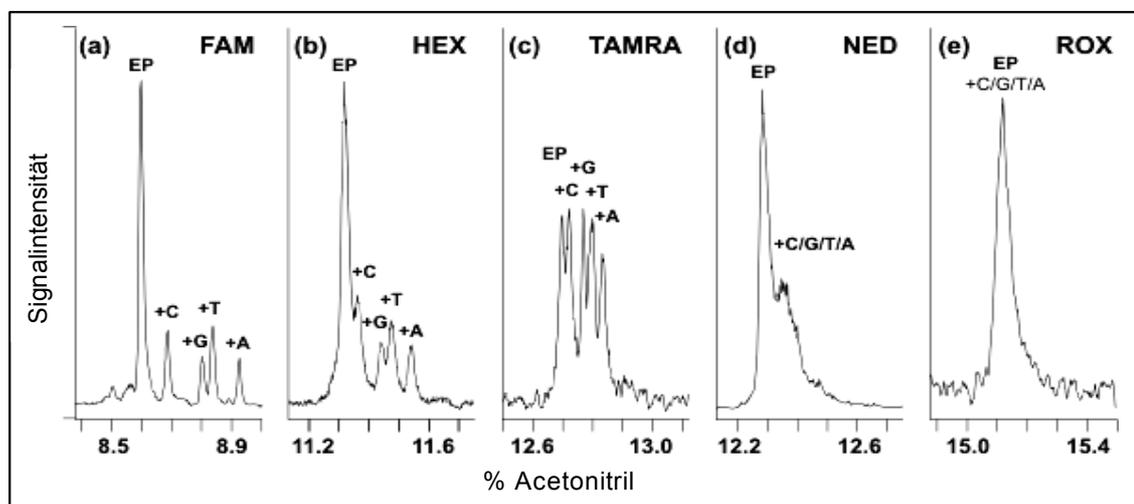
**Genotypisierung von tri-allelischen SNPs.** Auch mit *Minisequencing* konnte der tri-allelische T-C-A-SNPs GP23/271 erfolgreich quantitativ genotypisiert werden (Abb. 3-11).



**Abb. 3-11: Genotypisierung des tri-allelischen SNP GP23/271 mit SNUPE in Kombination mit DHPLC.** Es sind die Chromatogramme (Elutionsprofile) von vier verschiedenen Allelkompositionen des T-C-A-SNPs zu sehen. In (a) ist ein homozygoter Genotyp gezeigt, in (b) und (c) sind Allelkompositionen mit jeweils zwei allelischen Nucleotiden dargestellt, und in (d) ist das Ergebnis eines Genotyps mit allen drei allelischen Basen gezeigt. Das analysierte Fragment wurde mit den Primern GP23\_Fa1 und GP23\_Ra1 amplifiziert, als Extensionsprimer diente GP23-SNP\_271\_expr. Die DHPLC-Bedingungen entsprachen denen, die unter Abbildung 3-5 beschrieben sind, allerdings betrug die Säulentemperatur ausschließlich 90°C.

**Simultane DHPLC-Analyse.** Eine simultane Analyse von SNUPE-Produkten wurde auf dem 16-Array-HPLC mit 16 parallelen, monolithischen Säulen (Abb. 2-3) untersucht.

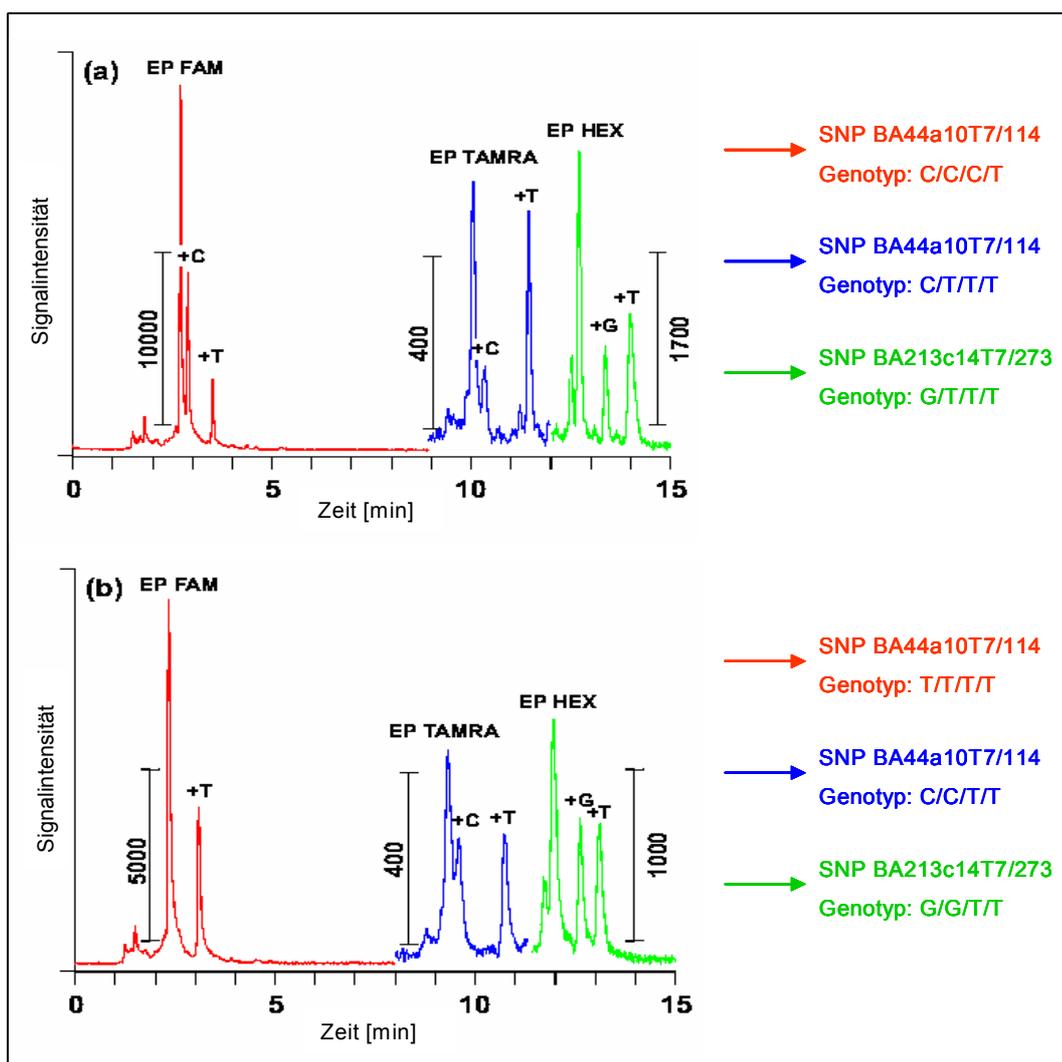
Da zur Detektion der Eluate ein Laser genutzt wurde, konnten fluoreszenzmarkierte Extensions-Primer eingesetzt werden. Zur Analyse der Separationseigenschaften bei verschiedenen Fluorophoren wurde der SNP Dys\_271/168, für welchen Klone mit allen vier allelischen Nucleotiden zur Verfügung standen (Oefner und Underhill, 1998), untersucht. Es wurden die Fluorophore HEX, TAMRA, NED, ROX und FAM getestet. Bei der Verwendung des Fluorophors NED war keine Separation der verschiedenen allelischen Extensionsprodukte möglich; bei ROX konnten weder die Extensionsprodukte untereinander, noch diese von dem unverbrauchten Extensions-Primer aufgetrennt werden. Waren die Extensions-Primer mit HEX, TAMRA oder FAM markiert, konnten sowohl die unverbrauchten Primer von den allelischen Produkten, als auch diese untereinander separiert werden (Abb. 3-12).



**Abb. 3-12:** Legende siehe nächste Seite.

**Abb. 3-12: Effekt verschiedener Fluorophore auf die Auftrennungseigenschaften.** Es wurden gemischte Proben der vier allelischen SNuPE-Produkte des SNP Dys\_271/168 auf dem 16-Array-HPLC Instrument untersucht. Der Extensions-Primer war mit den verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen (a) FAM, (b) HEX, (c) TAMRA, (d) NED und (e) ROX markiert. Die Proben wurden bei 60°C injiziert (Injektionsvolumen: 3µl) und zur Elution wurde ein linearer Gradient von 5% bis 16% Acetonitril bei einer Flussrate von 2,5 µl/min für 15 Minuten angelegt. Die eluierten Oligonukleotide, unverbrauchter Extensions-Primer (EP) und die Produkte der Extensionsreaktionen (+C, +G, +T, +A), wurden bei 525 nm (FAM), 555nm (HEX), 580nm (TAMRA und NED) und 605nm (HEX) nachgewiesen.

Da sich die Elutionsprofile von FAM, TAMRA und HEX nicht überlagerten, konnten Produkte, welche mit diesen Molekülen markiert worden waren, gemeinsam in einer Säule untersucht werden. Somit konnten auf dem HPLC-Instrument mit 16 Säulen insgesamt 48 Proben simultan analysiert und auch erfolgreich quantitativ genotypisiert werden. In Abbildung 3-13 sind beispielsweise die Elutionsprofile von zwei Säulen und die daraus ermittelten Genotypisierungsergebnisse gezeigt.



**Abb. 3-13: Simultane Analyse von 48 SNuPE-Produkten auf dem 16-Array-DHPLC Instrument mit 16 parallelen Säulen.** Die SNuPE-Produkte wurden in 48 getrennten Primer-Extensions-Reaktionen markiert. Dazu wurden Extensionsprimer mit drei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen eingesetzt (44a10T7\_SNP-114\_expr\_FAM, 44a10T7\_SNP-114\_expr\_TAMRA, 213c14T7\_SNP273\_expr\_HEX). Anschließend wurden jeweils drei unterschiedlich markierte Produkte gemischt und zusammen in eine der 16 monolithischen Säulen zur DHPLC-Analyse bei 80°C injiziert (Injektionsvolumen: 3µl). Zur Elution wurde ein linearer Gradient von 8,8 bis 13,4% Acetonitril bei einer Flussrate von 2,5 µl/min für 15 Minuten angelegt. Die eluierten Oligonukleotide, unverbrauchte Extensionsprimer (EP) und die Produkte der Extensionsreaktionen (+C, +T, +G), wurden bei 525 nm (FAM), 555nm (HEX) und 580nm (TAMRA) nachgewiesen. In der Abbildung sind die Chromatogramme von zwei der insgesamt 16 Säulen ((a) = Säule 6, (b) = Säule 7) und die anhand der Profile ermittelten Genotypisierungsergebnisse zu sehen.

**Kosten.** Die Kosten für die Genotypisierung von 96 Proben beliefen sich, inklusiv aller erforderlichen Arbeitsschritte und bei UV-gestützter Einzelanalyse bei der DHPLC, auf 160 €. Bei der Multiplex-DHPLC waren fluoreszenzmarkierte Extensions-Primer erforderlich, so dass sich dadurch die Kosten auf 350 € pro 96 Proben erhöhten (Tab. 3-12).

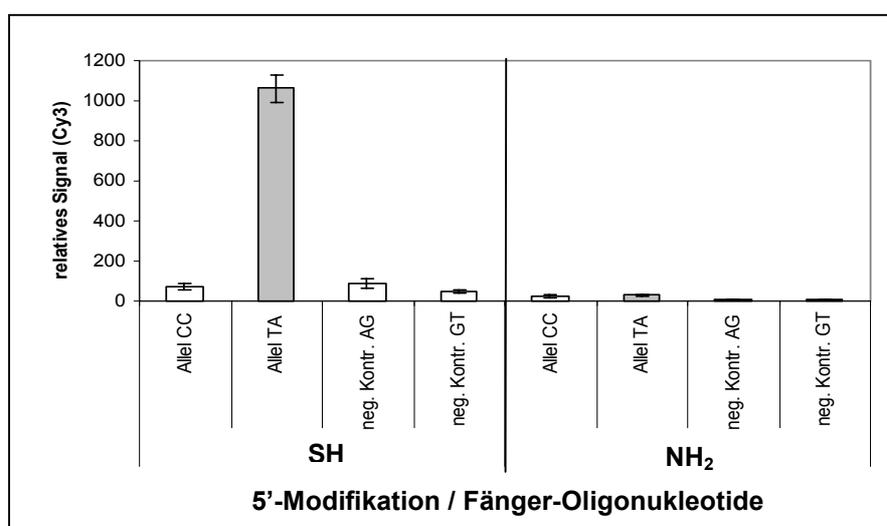
### 3.2.4. Allelspezifische Hybridisierung auf DNA-Chips

Die Methode des allelspezifischen Hybridisierens auf *Microarrays* wurde anhand von den drei Polymorphismen BA44a10T7/174, BA213c14T3/268+269 und BA213c14T7/452 getestet und optimiert. Für jeden Polymorphismus wurden insgesamt je 24 verschiedene Fänger-Oligonukleotide, welche sich bezüglich des polymorphen Nukleotids, der Orientierung und der relativen Lage der allelischen Base unterschieden, verwendet (Kap. 2.4.4.1). Jede dieser Sonden wurde pro *Microarray* drei Mal gespottet (Abb. 3-15).

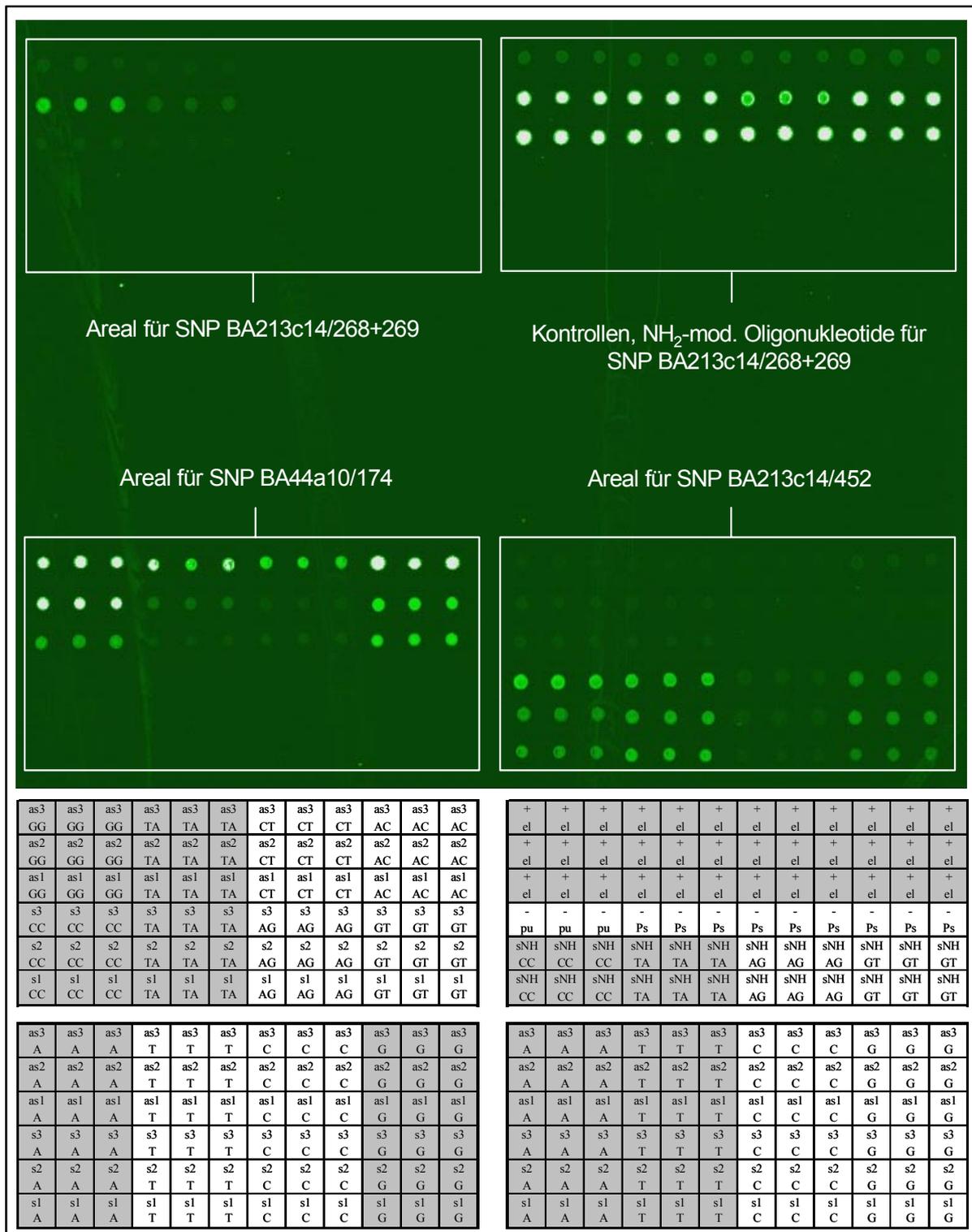
#### Optimierungen der Bedingungen zum Genotypisieren auf *Microarrays*:

Oberfläche der DNA-Chips: Es wurden Glasobjektträger zur Herstellung der *Micorarrays* verwendet, die entweder Epoxy- oder alternativ Aldehyd-aktivierte Oberflächen hatten. Die Qualität der Genotypisierungen bei den beiden Varianten wiesen keine signifikanten Unterschiede auf (Daten nicht gezeigt).

Modifikationen der aufgespotteten Fänger-Oligonukleotide am 5'-Ende: Für den Polymorphismus BA213c14T3/268+269 wurden vergleichend 5'-SH-modifizierte und 5'-NH<sub>2</sub>-modifizierte Fänger-Oligonukleotide *aufgespottet*. Es zeigte sich, dass mit den SH-modifizierten Oligonukleotiden deutlich stärkere und spezifischere Signale erhalten wurden als mit den NH<sub>2</sub>-modifizierte Fänger-Oligonukleotiden (Abb. 3-14, siehe auch Abb. 3-15).



**Abb. 3-14: Vergleich zwischen 5'-SH- und 5'-NH<sub>2</sub>-modifizierten Fänger-Oligonukleotiden zur allelspezifischen Hybridisierung auf *Microarrays*.** Es sind die Genotypisierungsergebnisse für den Polymorphismus BA213c14T3/268+269 mit den vier Fänger-Oligonukleotiden von 213-T3/268\_s2 (Tab. 9-6) jeweils mit der SH- (links) und mit der NH<sub>2</sub>-Modifikation am 5'-Ende (rechts) gezeigt. Das zu genotypisierende Allel ist grau hervorgehoben.

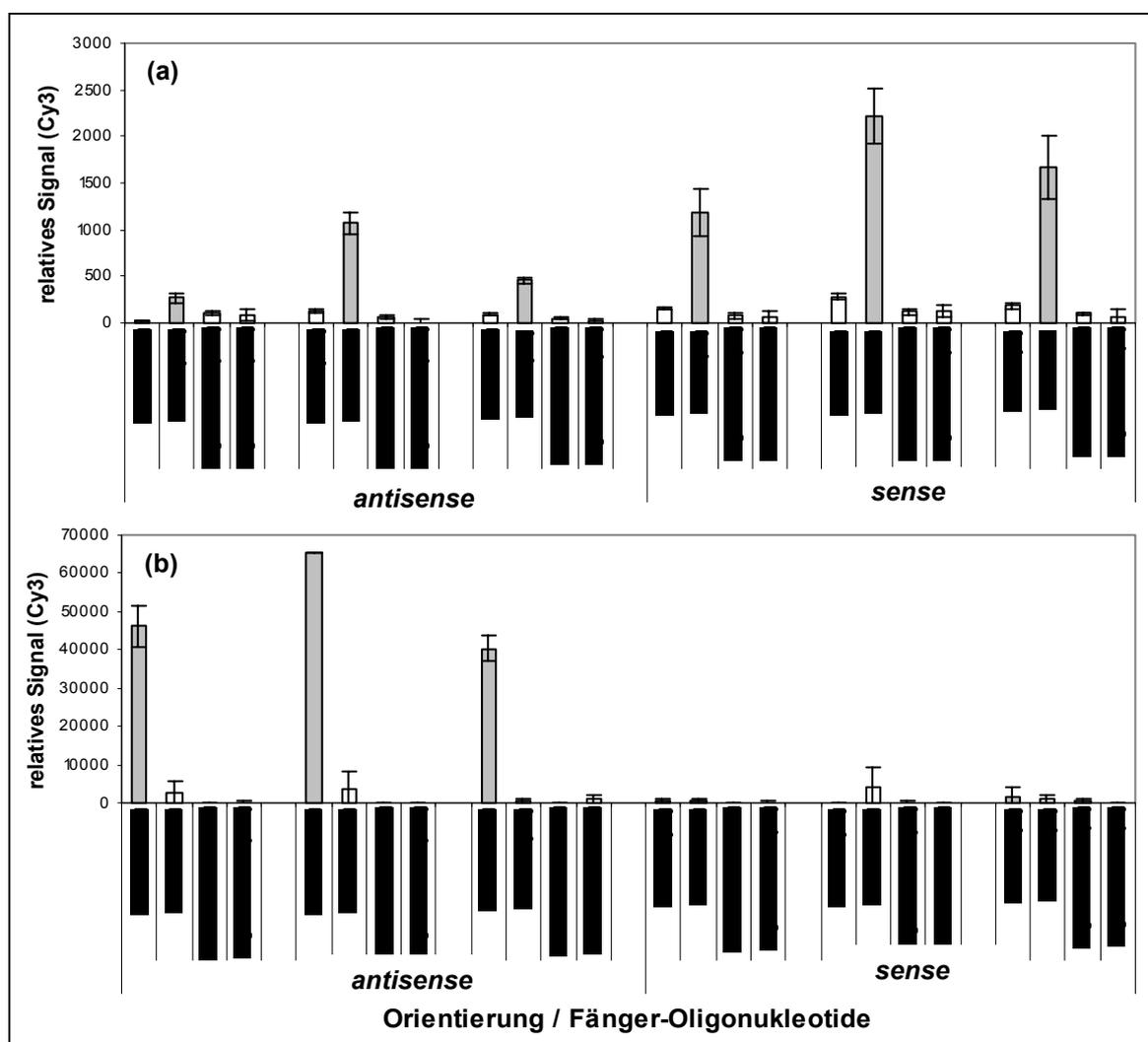


**Abb. 3-15: Hybridisierter Microarray und Spottingmuster.** Der DNA-Chip, auf welchen entsprechend dem im unteren Bildabschnitt gezeigten Muster Oligonukleotide (Sequenzen siehe Tab. 9-6) aufgetragen worden waren, wurde mit fluoreszenzmarkierten PCR-Produkten der drei SNPs hybridisiert. Der analysierte Genotyp war bezüglich der 3 Polymorphismen heterozygot (BA213c14/268+269: GGTT+GGAA, BA44s10/174: AAGG, BA213c14/452: AATT), so dass in den grau unterlegten Spottingpositionen Signale zu erwarten waren. as: antisense; s: sense; el: Oligonukleotide für Primer-Elongation, dienen hier als Positivkontrollen; pu: Puffer als Negativkontrolle; Ps: *Pseudomonas sigma*-DNA als Negativkontrolle.

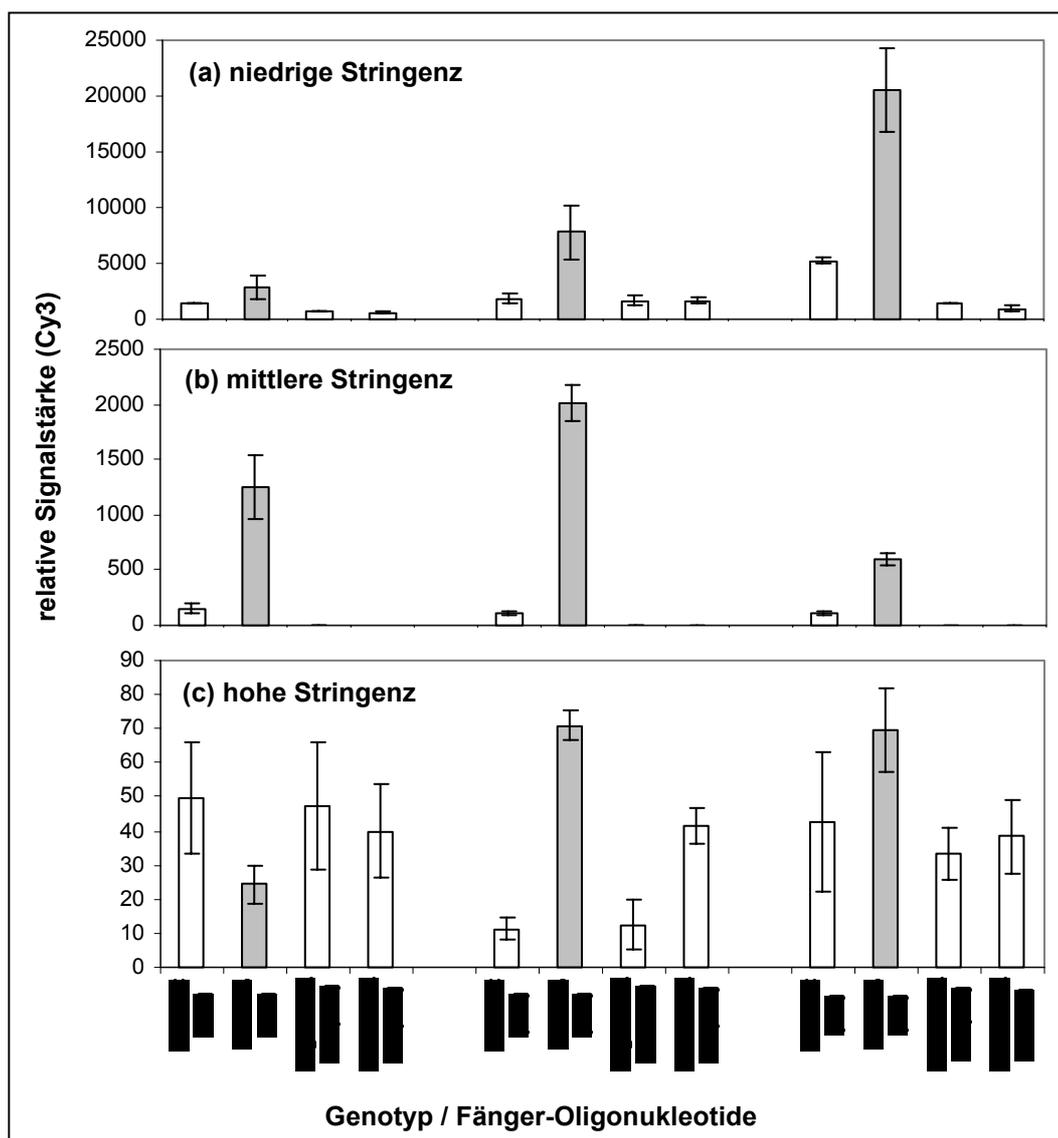
Relative Lage der polymorphen Position innerhalb der Fänger-Oligonukleotide: Die jeweils verwendeten Fänger-Oligonukleotidvariationen unterschieden sich neben der Orientierung

und der allelischen Base auch bezüglich der relativen Lage zur SNP-Stelle (Positionen 11, 14 und 17 vom 5'-Ende). Es wurde festgestellt, dass die Hybridisierungseffizienz teilweise stark von den Positionen abhing. Bei keinem SNP, keiner Orientierung und bei keiner gewählten Hybridisierungsbedingung erwies sich die Position 17 vom 5'-Ende als die spezifischste unter den drei jeweiligen Alternativen (Daten nicht gezeigt). Die zentrale Position 11 und die dem 3'-Ende zugewandene Lage 14 zeigten jeweils unter verschiedenen Bedingungen und Sequenzen unterschiedlich gute Resultate (Bsp. Abb. 3-17).

Orientierung der Fänger-Oligonukleotide: Für jeden untersuchten SNP wurden jeweils 12 verschiedene *sense* und 12 verschiedene *antisense* Oligonukleotide als Fänger-DNAs genutzt. Es zeigte sich, dass teilweise Hybridisierungen lediglich bei einer der beiden Orientierungen erfolgte (Abb. 3-16, siehe auch Abb. 3-15).



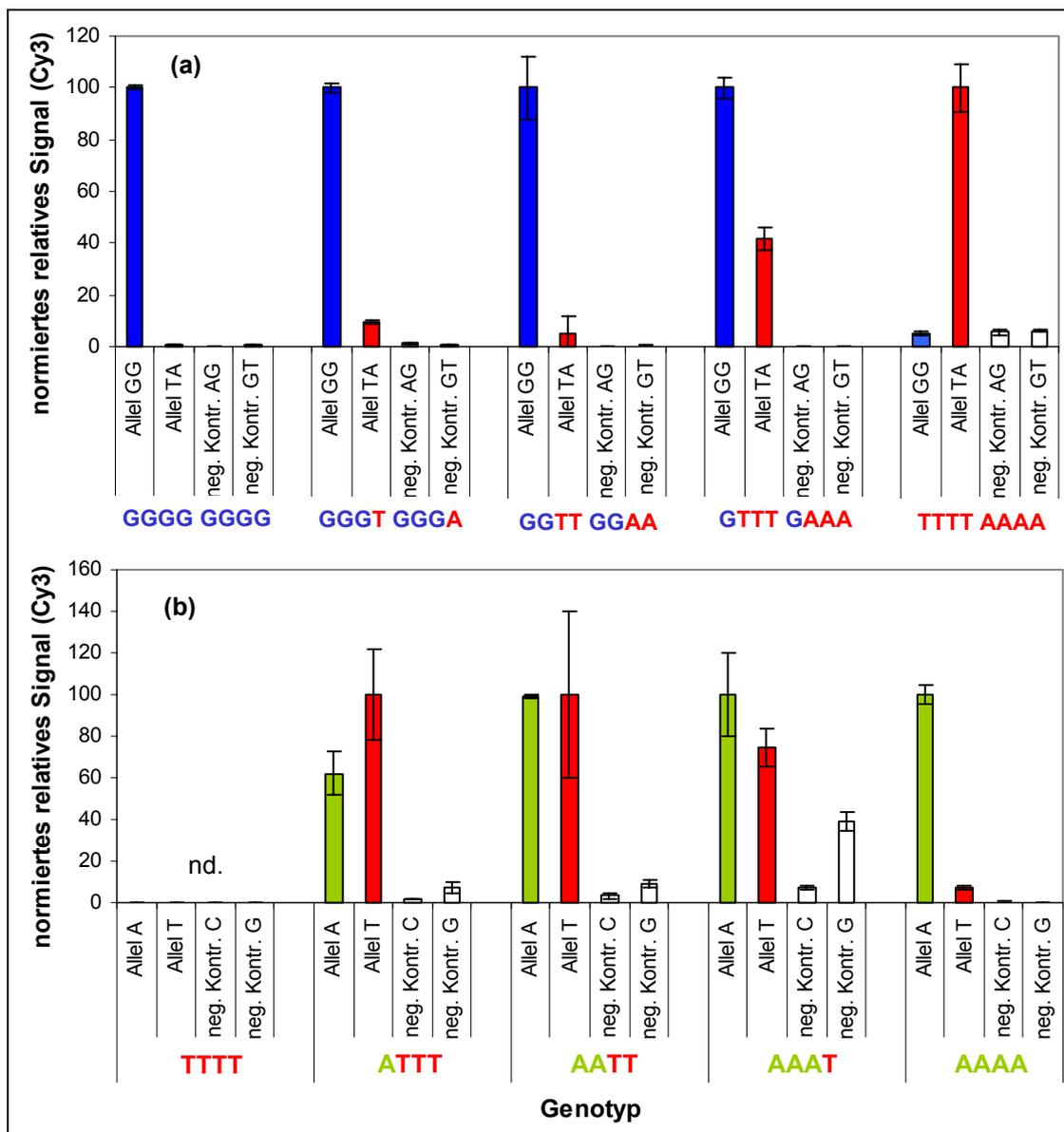
**Abb. 3-16: Einfluss der Orientierung der Fänger-Oligonukleotide auf die Hybridisierungsergebnisse bei der allelspezifischen Hybridisierung auf *Microarrays*.** In (a) sind die Ergebnisse einer Genotypisierung des SNPs BA213c14T7/452 zu sehen. Hier erfolgten Hybridisierungen mit den Oligonukleotiden beider Orientierungen. In (b) sind die Resultate einer Genotypisierung des doppelten SNPs BA213c14T3/268+269 dargestellt; lediglich die *antisense* orientierten Oligonukleotide hybridisierten mit den Zielsequenzen. Die in den Versuchen zu genotypisierenden Allele sind durch graue Balken hervorgehoben.

Einstellen der Hybridisierungsbedingungen:

**Abb. 3-17: Einfluss der Stringenzbedingungen während der Hybridisierung auf die Ergebnisse bei der allelspezifischen Hybridisierung auf *Microarrays*.** Gezeigt sind die Genotypisierungen des Polymorphismus BA213c14T3/268+269 bei dem gleichen homozygoten Genotyp (graue Balken) mit verschiedenen Hybridisierungspuffern: (a) QTM Hybridisierungspuffer (0% FA), (b) 30% FA, (c) 50% FA.

Bei allen drei Polymorphismen wurden verschiedene Hybridisierungsbedingungen getestet. Dazu wurde die Stringenz geändert, indem in der Hybridisierungslösung die Formamidkonzentration variiert wurde. Für alle drei Polymorphismen ergaben sich unterschiedliche optimale Bedingungen (BA44a10T7/174: 10% FA, BA213c14T3/268+269: 30% FA; BA213c14T7/452: 50% FA), allerdings war eine Analyse aller SNPs bei 35% FA möglich. Allgemein ist zu sehen, dass mit zunehmender Stringenz die Signalstärke abnimmt und die Spezifität gesteigert werden kann, bis zu der Konzentration, bei welcher auch die perfekt gebundenen Zielsequenzen abgewaschen werden (Abb. 3-17).

## Eignung zum Genotypisieren in tetraploiden Organismen:



**Abb. 3-18: Genotypisierung der möglichen Allelkompositionen in tetraploiden Kartoffeln mit allelspezifischer Hybridisierung auf *Microarrays*.** (a) Genotypisierungsergebnisse des doppelten SNPs BA213c14T3/268+269 für alle fünf möglichen Allelkompositionen. (b) Genotypisierungsergebnisse des SNPs BA213c14T7/452 für vier zur Verfügung stehende Allelkompositionen. Zum Vergleich der Signale aus den verschiedenen Hybridisierungen sind die prozentualen Werte der Signalstärken, wobei das jeweils stärkste Signal gleich 100% gesetzt worden war, aufgetragen. Die gezeigten Werte wurden mit den Fänger-Oligonukleotiden 213-T3/268\_as3 bzw. 213-T7/268\_as2 erhalten, die Hybridisierungen erfolgten bei 35% FA.

Mit der Methode des allelspezifischen Hybridisierens auf *Microarrays* wurden insgesamt drei Polymorphismen genotypisiert. Für den SNP BA44a10T7/174 erfolgte unter keiner gewählten Hybridisierungsbedingung eine allelische Diskriminierung (Daten nicht gezeigt). Bei den beiden anderen Polymorphismen konnten analysierbare Daten generiert werden (Tab. 3-10). Bei dem doppelten SNP BA213c14T3/268+269 war eine Genotypisierung der beiden homozygoten Genotypen möglich, bei den heterozygoten war aufgrund einer deutlich stärkeren Hybridisierung der Zielsequenzen an den GG-Fänger-Oligonukleotiden eine klare quantitative Diskriminierung nicht möglich (Abb. 3-18-a). Bei dem SNP BA213c14T7/452

konnten alle drei heterozygoten Allelkompositionen und der zur Verfügung stehende homozygote Genotyp erfolgreich voneinander unterschieden werden (Abb. 3-18-b).

**Kosten.** Bei *Microarray*-basierten Genotypisierungsmethoden kann ein SNP pro Chip nur einmal genotypisiert werden, allerdings können auf einem Chip theoretisch mehrere hundert verschiedene SNPs analysiert werden. Aufgrund dieser Rahmenbedingungen ist die Vergleichbarkeit mit den anderen Methoden problematisch, da sich die verglichenen Kosten jeweils auf 96 Analyse desselben SNPs beziehen. Da die Nutzung von Chips also erst mit der parallelen Analyse von mehreren SNPs sinnvoll ist, beziehen sich die Kostenangaben auf die Annahme, dass mit einem *Microarray* 10 bzw. 100 verschiedene SNPs analysiert werden. Unter dieser Annahme beläuft sich die Genotypisierung von 96 Proben mit allelspezifischer Hybridisierung auf *Microarrays* auf 385 € bzw. 205 € (Tab. 3-12).

### 3.2.5. Primer-Elongation auf DNA-Chips

Die Methode der Primer-Elongation auf *Microarrays* wurde mit drei Polymorphismen (BA44a10T7/174, BA213c14T3/268+269, BA213c14T7/452) auf die Eignung zum quantitativen Genotypisieren getestet.

**Optimierung der Zyklusbedingungen.** Zur Optimierung der Primer-Elongations-Reaktion wurden die *Annealing*- und Extensionszeiten variiert. Insgesamt zeigt der Vergleich eine Tendenz zu höherer Spezifität und Signalstärke mit zunehmenden *Annealing*- und Extensionszeiten (Abb. 3-19).

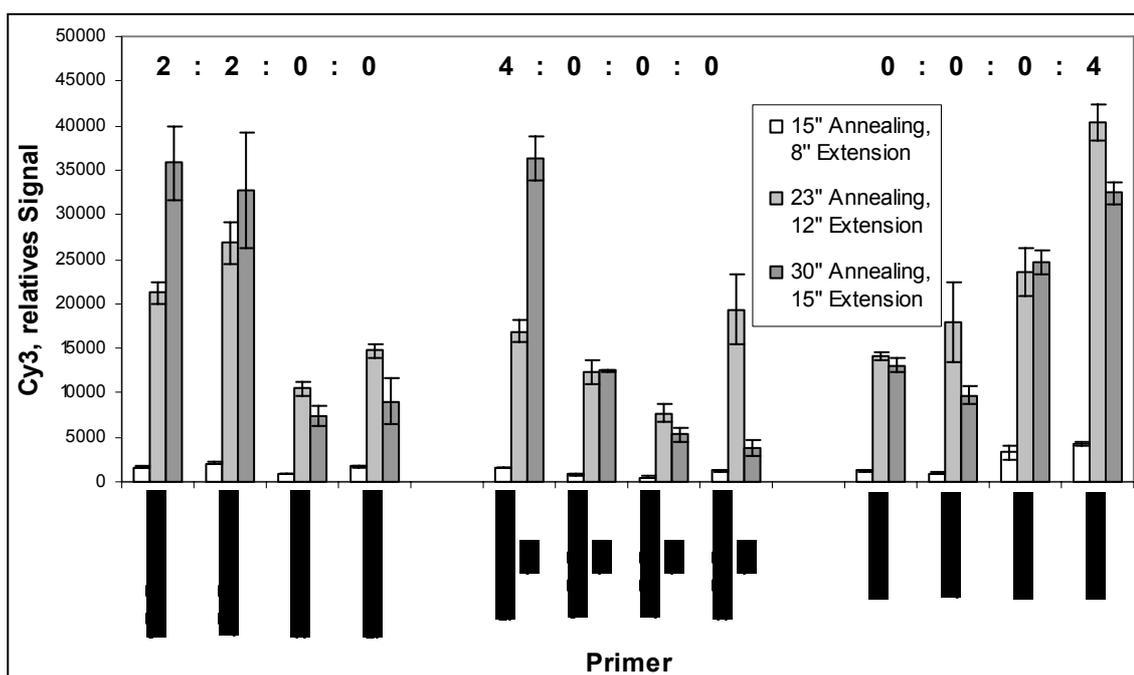
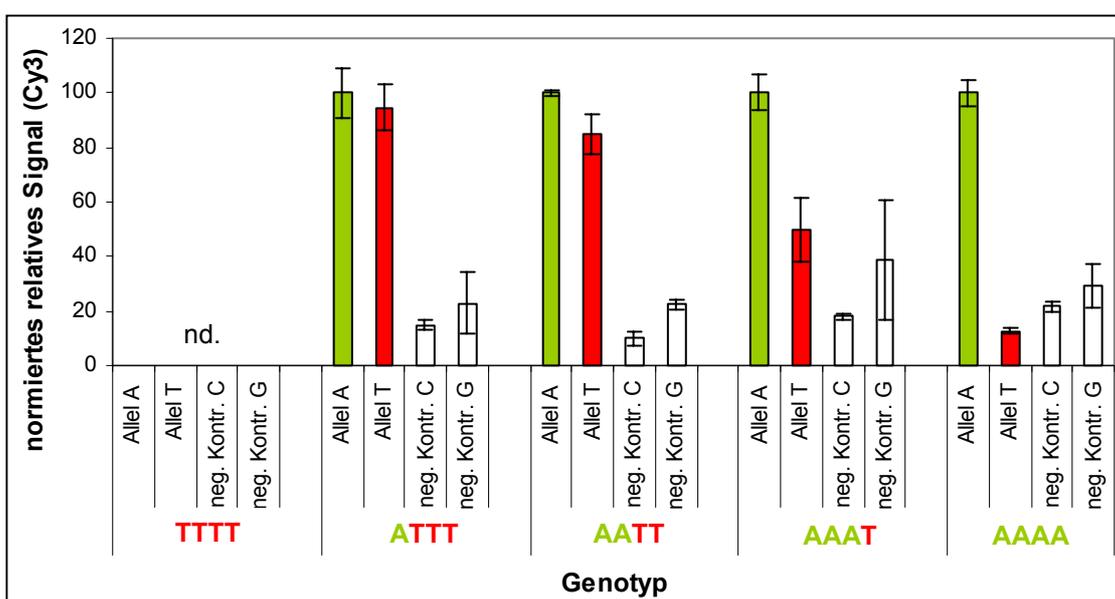


Abb. 3-19: Legende siehe nächste Seite.

**Abb. 3-19: Optimierung der Zyklusbedingungen bei der Primer-Elongations-Reaktion.** Es sind die Genotypisierungsergebnisse für jeweils einen Genotyp bei den drei untersuchten SNPs (von links nach rechts: BA213c14T7/452, BA213c14T3/268+269, BA44a10T7/174) bei drei verschiedenen *Annealing*- und Extensionszeiten gezeigt (siehe Kasten). Der Allelzustand ist über den Säulen angegeben (BA213c14T7/452: AATT, BA213c14T3/268+269: GGGG+GGGG, rechts: BA44a10T7/174: GGGG).

**Eignung zum Genotypisieren in tetraploiden Organismen.** Bei allen drei untersuchten SNPs waren relativ starke falsch-positive Signale zu beobachten, d. h., dass es auch dann zu Elongationen kam, wenn die auf dem DNA-Chip immobilisierten Primer mit den Zielsequenzen am 3'-Ende ein *mismatch* bildeten (siehe beispielsweise Abb. 3-19 und 3-20). Bei den SNPs BA44a10T7/174 und BA213c14T3/268+269 waren aufgrund dieser Unspezifität der Reaktionen keine klare Unterscheidung der verschiedenen Allelkompositionen möglich. Im Falle des SNPs BA213c14T7/452 erfolgten deutlich stärkere Elongationen bei den passenden Primern. Allerdings spiegelten die Signalverhältnisse bei den drei heterozygoten Allelzuständen nicht die richtigen Genotypen wider (Abb. 3-20). Trotz einer richtigen Tendenz konnten die gemessenen Werte nicht, vergleichbar mit der Vorgehensweise bei anderen Genotypisierungsmethoden (Kap. 3.1.1., Kap. 3.1.3.), durch einen Korrekturfaktor ausgeglichen werden. Somit ist also lediglich eine Unterscheidung zwischen homozygoten und heterozygoten Genotypen möglich.



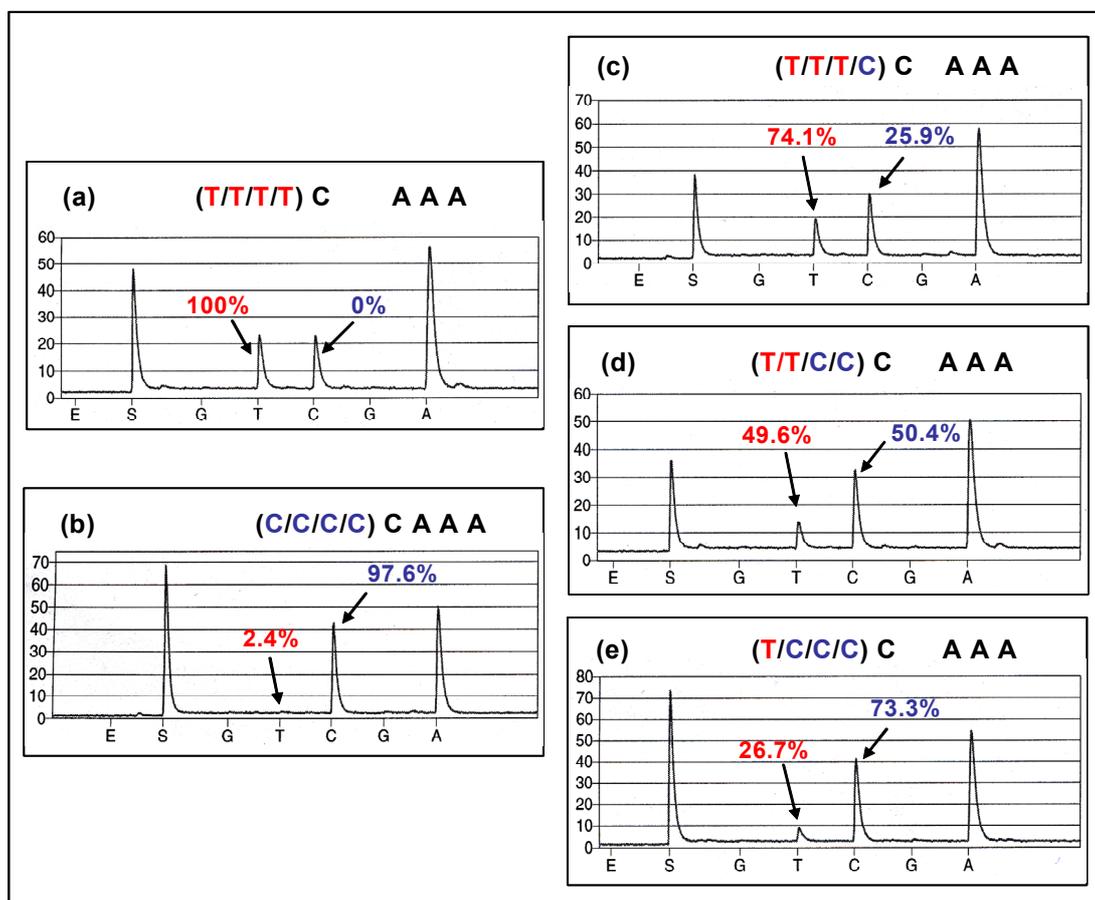
**Abb. 3-20: Genotypisierung verschiedener Allelkompositionen des SNPs BA213c14T7/452 in tetraploiden Kartoffeln mit Primer-Elongation auf *Microarrays*.** Zum Vergleich der Signale aus den verschiedenen Hybridisierungen sind die prozentualen Werte der Signalstärken, wobei das jeweils stärkste Signal gleich 100% gesetzt worden war, aufgetragen.

**Kosten.** Auch bei dieser *Microarray*-basierten Genotypisierungsmethoden wurden die Kosten auf der Annahme kalkuliert, dass mit einem *Microarray* 10 bzw. 100 verschiedene SNPs parallel analysiert werden. Somit belaufen sich die Kosten für Genotypisierung von 96 Proben mit Primer-Elongation auf *Microarrays* auf 405 € bzw. 225 € (Tab. 3-12).

### 3.2.6. Pyrosequencing

**Eignung zum Genotypisieren in tetraploiden Organismen.** Mit *Pyrosequencing* wurde die Mehrzahl der Polymorphismen für die Kartierungsarbeiten und die QTL-Analyse untersucht. Insgesamt wurden 85 SNPs und 3 Indels analysiert; von diesen konnten 68 Polymorphismen erfolgreich quantitativ ausgewertet werden (Tab. 3-10). Bei 12 der zufriedenstellend genotypisierten SNPs war ein nochmaliges Entwerfen der Sequenzier-Primer erforderlich (Daten nicht gezeigt). Die genutzten Oligonukleotide und jeweiligen Erfolge bei den einzelnen Tests können Tabelle 9-2 entnommen werden.

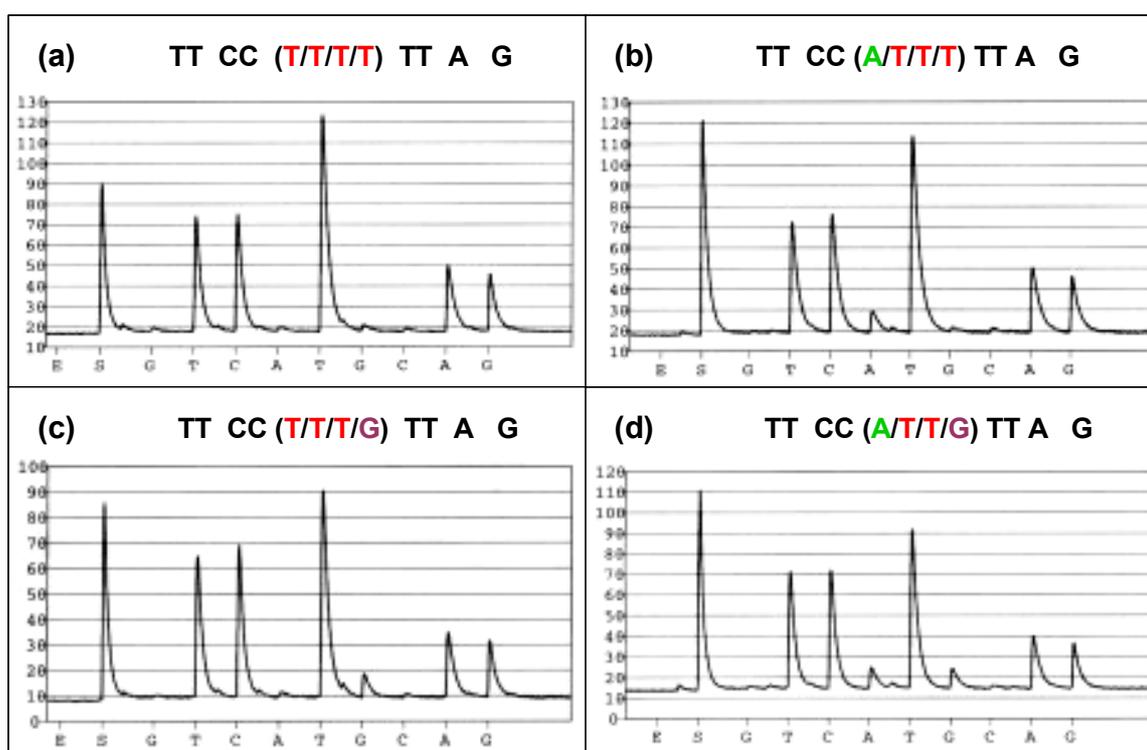
In der Abbildung 3-21 sind beispielsweise die Elektropherogramme des binären SNP BA44a10T7/114 von allen fünf möglichen Allelverhältnissen zu sehen.



**Abb. 3-21: Genotypisierung des binären SNP BA44a10/114 mit *Pyrosequencing*.** Bei der zu analysierenden Sequenz handelte es sich um einen T-C-SNP, gefolgt von einem konservierten C und drei konservierten A's. Diese Sequenz widerspiegelnd wurden in der *Pyrosequencing*-Reaktion (zur Erläuterung des Prinzips siehe Kap. 1.5.1.7.) die Nukleotide T, C und A zugegeben. Als Negativkontrollen wurden zweimal G's hinzugefügt. Somit ergab sich die auf der x-Achse angezeigte Dipensionsfolge: GTCGA. Vor der Nukleotidzugabe wurden die Enzyme (E) und die Substrate (S) beigefügt. Auf der y-Achse ist die Intensität der Lumineszenzsignale, welche proportional zur Menge an eingebauten Nukleotiden sind, angezeigt. Der Sequenz entsprechend werden in einem tetraploiden Genom 4 bis 8 C's (bezogen auf die Chromosomenanzahl) während der *Pyrosequencing*-Reaktion eingebaut; abhängig von dem Genotyp 0 bis 4 C's an der polymorphen Position und 4 C's bei der nachfolgenden konservierten C-Base. Das Signal für das allelische T entspricht 0 bis 4 T's. Die Prozentwerte geben die auf der Grundlage der Peakhöhen berechneten Verteilungen der allelischen Basen an. Somit ist jeweils bei der Prozentangabe für C die Signalstärken abgezogen, welche von dem konservierten C stammt. Über jedem Pyrogramm ist der analysierte Genotyp aufgeführt. (a) und (b) zeigen die beiden homozygoten Zustände, in (c), (d) und (e) sind die Genotypisierungsergebnisse der drei heterozygoten Allelverteilungen dargestellt. Das analysierte Fragment wurde mit dem Primer 44a10T7\_Fa1 und dem biotinylierten Oligonukleotid 44a10T7\_Ra1 amplifiziert, als Sequenzier-Primer diente 44a10T7\_SNP-114

Zur Einschätzung der Reproduzierbarkeit und quantitative Genauigkeit bei der Genotypisierung mit *Pyrosequencing* wurden auch die mit dieser Methode erhobenen Daten der SNPs BA44a10T7/114 und BA228g19T7/70 statistisch ausgewertet (Tab. 3-11). Die größte gemessene individuelle Abweichung bei einem 3:1-heterozygoten Genotyp lag bei 13%, so dass in diesem Falle keine Genotypisierung hätte erfolgen können. Alle anderen Genotypen konnten korrekt einem der fünf möglichen Allelverhältnissen zugewiesen werden; die durchschnittliche Abweichung lag bei 2,8%.

**Genotypisierung von tri-allelischen SNPs.** Eine exakte Diskriminierung von tri-allelischen Zuständen war mit *Pyrosequencing* möglich (Abb. 3-22).

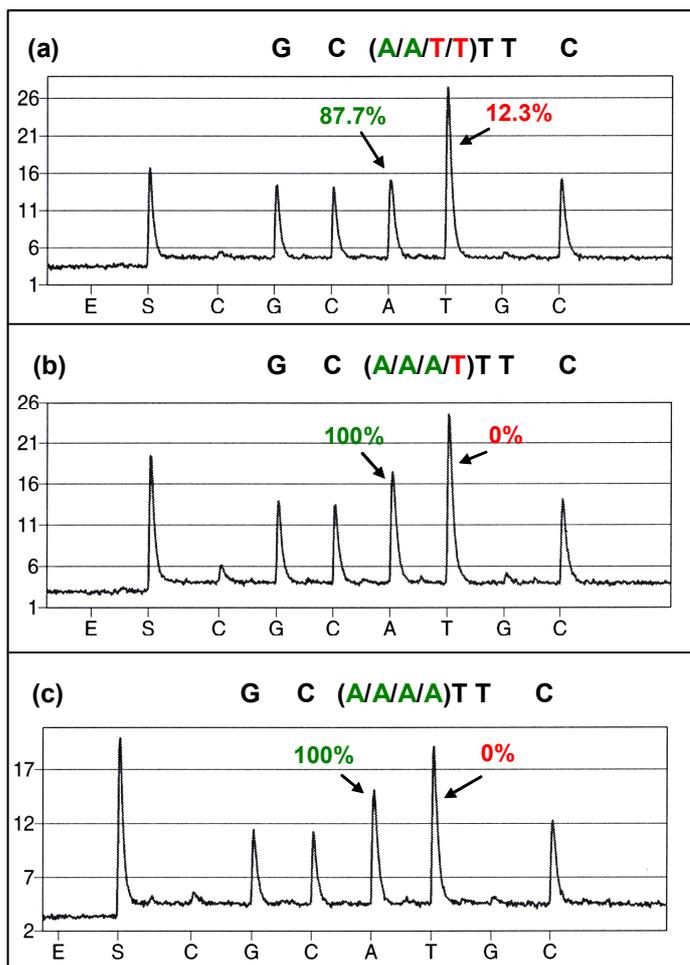


**Abb. 3-22: Genotypisierung des tri-allelischen SNP GP23/271 mit *Pyrosequencing*.** Es sind die Pyrogramme von vier verschiedenen Allelkompositionen des T-C-A-SNPs zu sehen. In (a) ist ein homozygoter Genotyp gezeigt, in (b) und (c) sind Allelkompositionen mit jeweils zwei allelischen Nukleotiden dargestellt, und in (d) ist das Ergebnis eines Genotyps mit allen drei allelischen Basen gezeigt. Das analysierte Fragment wurde mit dem biotinylierten Oligonukleotid GP23\_Fa1-bio und dem Primer GP23\_Ra1 amplifiziert, zum Sequenzieren des *antisense*-Stranges diente GP23-SNP\_271\_as. Die Sequenz ist über den Pyrogrammen angegeben; hierbei sind die Allelverteilungen des SNP in Klammern gezeigt. Die verwendete Dispensionsfolge der Nukleotide ist auf der x-Achse aufgetragen (GTCATGCAG). Beim Vergleich der Genotypisierungsergebnisse dieses SNP mit anderen Methoden (Abb. 3-5 und Abb. 3-9) ist zu berücksichtigen, dass in diese Falle der *antisense*-Strang sequenziert wurde.

### Genotypisierung von SNPs, bei denen eines der Allele Teil eines Homopolymers ist.

Ist eine allelische Base Teil eines Homopolymers, folgen also die gleichen Nukleotide auf eine Base des SNPs, dann addieren sich die Signale für dieses Nukleotid bei der Sequenzierung. Die im Rahmen dieser Arbeit analysierten SNPs zeigen, dass eine exakte quantitative Genotypisierung möglich ist, wenn das Homopolymer aus zwei Nukleotiden

besteht (Abb. 3-21), die Ergebnisse allerdings ungenau und fehlerhaft sind, wenn eine allelische Base Bestandteil eines Homopolymers bestehend aus drei Basen ist (Abb. 3-23).



**Abb. 3-23: Genotypisierung eines binären SNPs (BA66k2T3/212) mit Pyrosequencing, wobei eines der allelischen Nukleotide Teil eines Homopolymers bestehend aus drei Basen ist.** Bei dem Abschnitt handelte es sich um folgende Sequenz: GC[A-T]TTC. Somit ist das polymorphe T-Allel Bestandteil eines Homopolymers mit drei T's. Diese Sequenz widerspiegelnd wurden in der Pyrosequencing-Reaktion Nukleotide in folgender Abfolge zugegeben: CGCATGC (siehe x-Achse). Auf der y-Achse ist die Intensität der Lumineszenzsignale, welche proportional zur Menge an eingebauten Nukleotiden sind, angezeigt. Der Sequenz entsprechend werden in einem tetraploiden Genom 8 bis 12 T's (bezogen auf die Chromosomenanzahl) während der Pyrosequencing-Reaktion eingebaut; abhängig von dem Genotyp 0 bis 4 T's an der polymorphen Position und 8 T's bei den nachfolgenden konservierten T-Basen. Die Prozentwerte geben die auf der Grundlage der Peakhöhen berechneten Verteilungen der allelischen Basen an. Über jedem Pyrogramm ist der Genotyp aufgeführt. In (a) ist die Genotypisierung eines „2:2“ heterozygoten Individuums gezeigt. Somit wäre hierbei eine Verteilung von 50% A und 50% T zu erwarten gewesen. Stattdessen wurde ein Verhältnis von 87,7% A und 12,3% T bestimmt. In (b) wurden dieselben Genotypisierungsergebnisse erzielt, obwohl in (b) ein A/A/A/T-Genotyp und in (c) ein A/A/A/A-Genotyp analysiert

worden war. Bei allen Berechnungen wurde bereits berücksichtigt, dass das ATP-Derivat  $\alpha$ ATP stärkere Signale erzielt werden als mit den anderen Nukleotiden (Ronaghi 2001). Das Fragment wurde mit dem Primer 66k2T3\_fa1 und dem biotinylierten Oligonukleotid 66k2T3\_ra1-bio amplifiziert, als Sequenzierprimer diente 66k2T3\_SNP-212.

**Einfluss von SSB.** Bei allen mit Pyrosequencing nicht erfolgreich zu genotypisierenden SNPs wurde der Einfluss von SSB-Protein (*single strand binding protein*) auf die Qualität der Genotypisierungsergebnisse getestet. Bei einem Polymorphismus (SNP 121o17/289) konnte eine Verbesserung der Pyrogramme ab 500 ng SSB festgestellt werden und bei einer Zugabe von 1000 ng war eine exakte Genotypisierung der Proben möglich (Abb. 3-24).

**Abb. 3-24: Einfluss von SSB-Protein (*single strand binding protein*) auf die Qualität der Pyrosequencing-Ergebnisse bei dem SNP 121o17/289.** Bei der Sequenz handelte es sich um einen G-C-SNP, gefolgt von einem konservierten A. Diese Sequenz widerspiegelnd wurden in der Pyrosequencing-Reaktion die Nukleotide T, C und A zugegeben. Als Negativkontrollen wurden vor dem SNP G und nach dem Polymorphismus T hinzugefügt. Somit ergab sich die auf der x-Achse angezeigte Dipensionsfolge: AGCTA. Vor der Nukleotidzugabe wurden die Enzyme (E) und die Substrate (S) beigefügt. Auf der y-Achse ist die Intensität der Lumineszenzsignale, welche proportional zur Menge an eingebauten Nukleotiden sind, angezeigt. Das Fragment wurde mit dem Primer 121o1T7\_Ca1 und dem biotinylierten Oligonukleotid 121o1T7\_D-bio amplifiziert, als Sequenzier-Primer diente 121o1T7\_SNP-289. Gezeigt sind die Pyrogramme eines homozygoten G/G/G/G Genotyps bei der Verwendung von (a) 0 ng SSB, (b) 500 ng SSB, (c) 1000 ng SSB und (d) 1500 ng SSB.

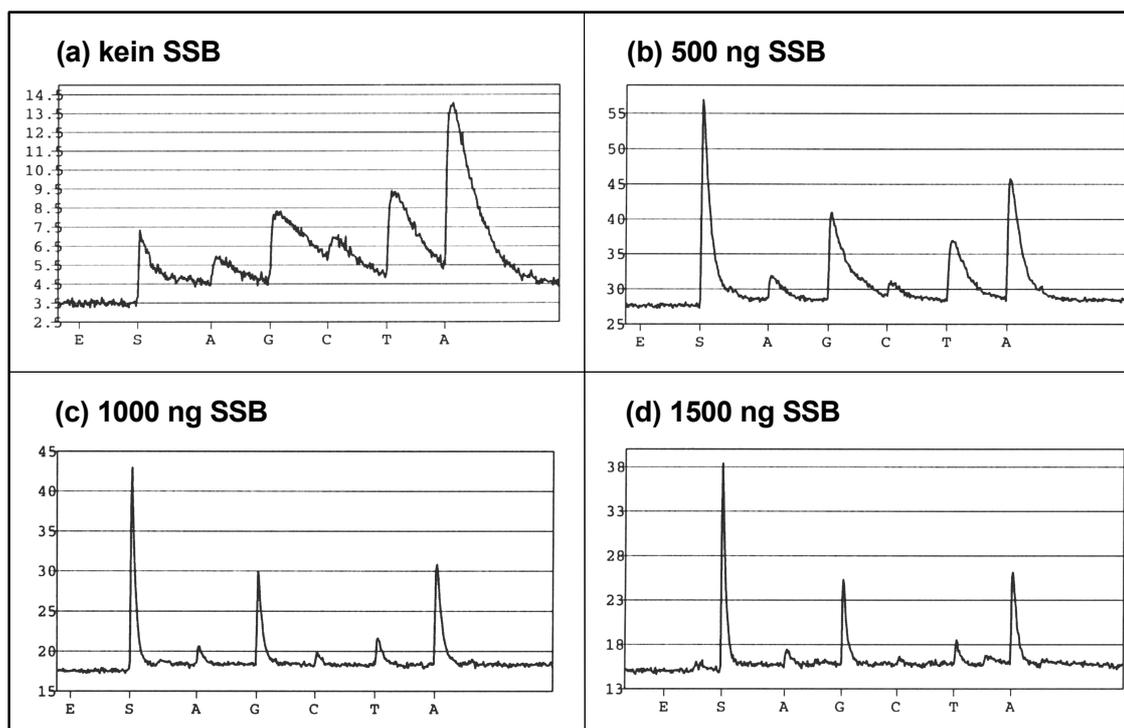


Abb. 3-24: Legende siehe vorherige Seite.

**Quantitative Genauigkeit.** Zur weiteren Untersuchung der quantitativen Genauigkeit von *Pyrosequencing* wurden die aus homozygoten Genotypen erstellten allelischen Mischungen mit 10%-Abstufungen (siehe auch Kap. 3.1.3.) genotypisiert. Die Abweichungen bewegten sich zwischen 3,1% bis 10% von den tatsächlich vorhandenen Verhältnissen. Es ist zu bemerken, dass tendenziell jeweils das Allel überschätzt wird, welches in der vorliegenden Mischung den geringeren Anteil ausmacht (Abb. 3-25).

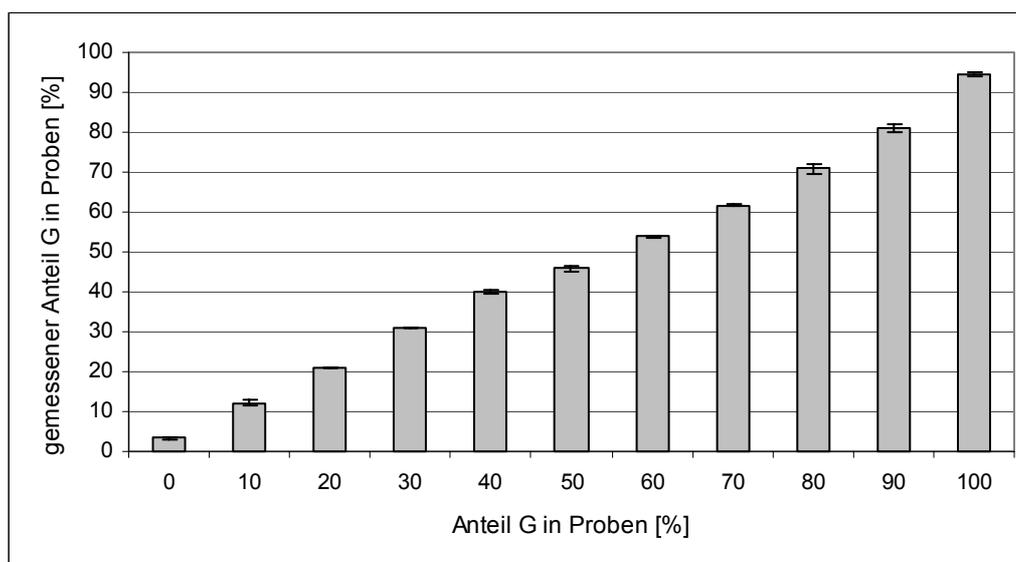


Abb. 3-25: Analyse der quantitativen Genauigkeit von *Pyrosequencing* zur Bestimmung von Allelfrequenzen. Zwei bezüglich des SNPs BA213c14T3/268 homozygote Genotypen (Leyla = T/T/T/T, 49 = G/G/G/G) wurden in Verhältnissen von 0% bis 100% in 10%-Abstufungen gemischt und diese Mischproben mit *Pyrosequencing* jeweils zweifach genotypisiert. Es sind die gemessenen %-Anteile des Allels G in den Proben gegen die tatsächlich in den Proben vorhandenen %-Anteile des Allels G aufgetragen.

**Bestimmung von Allelfrequenzen in DNA-Pools.** Für Assoziations- und Kopplungsstudien ist die Bestimmung von Allelfrequenzen in Populationen bzw. Subgruppen von Population von entscheidender Bedeutung. Deshalb sollte getestet werden, ob mit *Pyrosequencing* die exakte Bestimmung von Allelfrequenzen in *gepoolten* genomischen DNAs möglich ist. Dazu wurden zwei SNPs (44a10T3/114, 44a10T3/174) zunächst individuell in den Genotypen der Untersuchungspopulation genotypisiert. Es wurden aber auch Subpopulationen unterschiedlicher Größen und mit verschiedenen Genotypen aus der Untersuchungspopulation zusammengestellt, nachdem die Konzentrationen der genomischen DNAs zuvor mit *PicoGreen* exakt eingestellt worden waren. In diesen DNA-Pools wurden die Allelfrequenzen bestimmt und diese Ergebnisse konnten anschließend mit den erwarteten Frequenzen, welche durch die Aufsummierung der Einzelgenotypisierungen ermittelt worden waren, verglichen werden. Die Abweichungen betragen zwischen 0,1% und 8,1% (Tab. 3-9).

**Tab. 3-9: Untersuchungen zur Bestimmung von Allelfrequenzen in Populationen auf der Basis von gepoolten genomischen DNAs mit Hilfe von *Pyrosequencing*.** Es wurden fünf DNA-Pools verschiedener Größen (N) und Zusammensetzungen mit Genotypen aus der QTL-Untersuchungspopulation erstellt. Die Allelfrequenzen der SNPs (a) 44a10T3/114 und (b) 44a10T3/174 wurden in den Pools mit *Pyrosequencing* bestimmt. Die hierfür angegebenen Ergebnisse zeigen den Mittelwert aus jeweils zwei Wiederholungen. Die in die Pools eingegangenen Genotypen wurden auch individuell genotypisiert und die zu erwartenden Allelfrequenzen in den Pools durch Aufsummierung der Einzelergebnisse ermittelt. Somit konnten die Abweichungen von den in den Pools vorhandenen Allelfrequenzen mit den Ergebnissen aus den Untersuchungen der *gepoolten* genomischen DNAs bestimmt werden.

(a) Population (N)	Pool 1 (8)		Pool 2 (16)		Pool 3 (24)		<i>controls</i> (24)		<i>cases</i> (28)	
	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T
Aufsummierte Allelfrequenz [%]	37,5	62,5	32,8	67,2	33,3	66,7	37,0	63,0	41,1	58,9
Allelfrequenz in Pool [%]	45,6	54,4	45,6	54,4	41,0	59,0	41,6	58,4	45,9	54,1
Abweichung [%]	8,1		7,6		7,7		4,6		4,8	

(b) Population (N)	Pool 1 (8)		Pool 2 (16)		Pool (24)		<i>controls</i> (24)		<i>cases</i> (28)	
	G	A	G	A	G	A	G	A	G	A
Aufsummierte Allelfrequenz [%]	21,9	78,1	23,4	76,6	24,0	76,0	26,6	73,4	37,0	63,0
Allelfrequenz in Pool [%]	52,1	74,9	24,5	75,5	25,2	74,8	26,5	73,5	30,5	69,5
Abweichung [%]	3,2		1,1		1,2		0,1		6,5	

**Kosten.** Die Genotypisierung von 96 Proben mit *Pyrosequencing* kostete, inklusiv aller erforderlichen Arbeitsschritte, 355 € (Tab. 3-12).

**Tab. 3-10: Anzahl untersuchter Polymorphismen aufgeschlüsselt nach Genotypisierungsmethoden und deren Erfolgsquote.** Die angegebenen Werte zeigen zum einen an, ob eine Differenzierung zwischen den beiden homozygoten und heterozygotem Allelzustand möglich war; zum anderen sind in den Klammern die Erfolgsquoten angegeben, wenn eine quantitative Genotypisierung, also eine Unterscheidung aller fünf Allelkompositionen durchgeführt werden konnte. \*Bei den PCR-basierten Methoden handelt es sich um zwei allelspezifische PCRs und eine DFLP-Analyse.

Methode	Anzahl untersuchter SNPs/Indels	Anzahl erfolgreich untersuchter SNPs/Indels	Erfolgsquote [%]
<i>BigDye-Sequencing</i>	6	6 (6)	<b>100 (100)</b>
PCR-basierte Methoden*	3	2 (0)	<b>67 (0)</b>
<i>Minisequencing</i>	16	16 (16)	<b>100 (100)</b>
Hybridisierung auf DNA-Chips	3	2 (1)	<b>67 (33)</b>
Primer Elongation auf DNA-Chips	3	1 (0)	<b>33 (0)</b>
<i>Pyrosequencing</i>	88	68 (68)	<b>77 (77)</b>

**Tab. 3-11: Genauigkeit und Reproduzierbarkeit des Genotypierens mit den Methoden *BigDye-Sequencing*, *Minisequencing* (SNuPE+DHPLC) und *Pyrosequencing*.** Mit jeder Methoden wurden bei den SNPs (a) BA228g19T7/70 und (b) BA44a10T7/114 die drei möglichen heterozygoten Genotypen bei verschiedenen Pflanzen genotypisiert und für jede Gruppe die Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet, sowie die Streuungen ermittelt. Beim *BigDye-Sequencing* und beim *Minisequencing* sind die bereits korrigierten Werten angegeben. Die Korrektur erfolgte, indem auf der Basis eines bekannten „2-2“-heterozygoten Individuums der jeweilige Korrekturfaktor k berechnet worden war und mit diesem die anderen Verhältnisse angepasst werden konnten.

(a) Genotyp (N)	AAAG (5)		AAGG (10)		AGGG (14)	
	A	G	A	G	A	G
Allelfrequenz [%]	MW ± STABW Streuung					
<i>BigDye-Seq. forward + reverse</i>	67,6 ± 3,2 64,8 - 73,3	32,4 ± 3,2 26,7 - 35,2	50,0 ± 1,6 47,0 - 51,8	50,0 ± 1,6 48,2 - 53,0	23,8 ± 1,1 22,0 - 25,6	76,2 ± 1,1 74,4 - 78,0
<i>Minisequencing</i>	64,8 ± 6,4 58,0 - 76,1	35,2 ± 6,4 23,9 - 42,0	50,1 ± 2,8 46,2 - 54,4	49,9 ± 2,8 45,6 - 54,4	32,2 ± 1,4 30,0 - 34,1	67,8 ± 1,4 65,9 - 70,0
<i>Pyrosequencing</i>	65,6 ± 2,9 62,0 - 69,0	34,4 ± 2,9 31,0 - 38,0	49,8 ± 6,0 40,0 - 60,0	50,2 ± 6,0 40,0 - 60,0	24,9 ± 1,8 21,0 - 28,0	75,1 ± 1,8 72,0 - 79,0

Fortsetzung Tab. 3-11:

(b) Genotyp (N)	TTTC (21)		TTCC (23)		TCCC (6)	
	T	C	T	C	T	C
Allelfrequenz [%]	MW ± STABW Streuung					
<i>BigDye-Seq.</i> <i>forward + reverse</i>	75,5 ± 2,9 71,6 - 78,5	24,5 ± 2,9 21,5 - 28,4	50,1 ± 1,8 48,0 - 52,1	49,9 ± 1,8 47,9 - 52,0	26,3 ± 4,0 22,4 - 30,8	73,7 ± 4,0 69,2 - 77,6
nur <i>forward</i>	74,2 ± 2,5	25,8 ± 2,5	50,0 ± 2,0	50,0 ± 2,0	22,8 ± 0,5	77,2 ± 0,5
nur <i>reverse</i>	76,8 ± 1,6	23,2 ± 1,6	50,0 ± 0,8	50,0 ± 0,8	29,7 ± 1,3	70,3 ± 1,3
<i>Minisequencing</i>	70,3 ± 3,8 63,2 - 76,1	29,7 ± 3,8 23,9 - 36,8	49,8 ± 3,9 41,0 - 57,0	50,2 ± 3,9 43,0 - 59,0	32,3 ± 1,1 31,1 - 34,1	67,7 ± 1,1 65,9 - 68,9
<i>Pyrosequencing</i>	71,5 ± 2,9 65,0 - 80,0	28,9 ± 3,7 20,0 - 35,0	48,4 ± 3,3 42,0 - 57,0	51,6 ± 3,3 43,0 - 58,0	26,8 ± 1,8 24,0 - 30,0	73,2 ± 1,8 70,0 - 76,0

**Tab. 3-12: Kosten für die Genotypisierung von 96 Proben mit verschiedenen Methoden.** Die Kostenangaben berücksichtigen nur die Material und Verbrauchsmittelkosten, aber keine Assay-Entwicklungs- und Arbeitskosten. Die Werte beziehen sich auf Preise, die am SGTC (CA, USA) im Jahr 2001 bzw. am MPIZ im Jahr 2002 bezahlt wurden. Bei den Primern handelt es sich jeweils um den Preis für die kleinstmögliche Synthesemenge, welche für bis zu 1000 Genotypisierungsanwendungen reichen kann. \*Bei den PCR-basierten Methoden wurden allelspezifische PCRs und DFLP-Analysen genutzt. †Die Preisangaben für das *Minisequencing* beziehen sich auf DHPLC-Analysen ohne fluoreszenzmarkierte Extensionsprimer. †Bei den Chip-basierten Methoden sind die Kosten auf der Annahme erhoben, dass auf einem Chip 10 bzw. 100 verschiedene SNPs analysiert werden.

Methode	Materialien und Arbeitsschritte	Kosten [€]
<i>BigDye-Sequencing</i>	Primer für PCR	50
	PCR und Probenaufbereitung	25
	<i>Cycle Sequencing</i> und Sequenziergel	500
	Summe	<b>575</b>
PCR-basierte Methoden*	Primer für PCR	50
	PCR	25
	Summe	<b>75</b>
<i>Minisequencing</i> (SNuPE+DHPLC)	Primer für PCR und Sequenzierung <sup>†</sup>	75 <sup>†</sup>
	PCR und Probenaufbereitung	25
	Primer-Extension	30
	DHPLC	30
	Summe	<b>160<sup>†</sup></b>
Hybridisierung auf DNA-Chips	Primer für PCR	50
	PCR und Probenaufbereitung	130
	Erstellen der DNA-Chips	205 / 25 <sup>x</sup>
	Summe	<b>385 / 205<sup>x</sup></b>
Primer Elongation auf DNA-Chips	Primer für PCR	50
	PCR und Probenaufbereitung	25
	Erstellen der DNA-Chips	200 / 20 <sup>x</sup>
	Primer Elongation	130
	Summe	<b>405 / 225<sup>x</sup></b>
<i>Pyrosequencing</i>	Primer für PCR und Sequenzierung	225
	PCR und Probenaufbereitung	30
	Sequenzierung	100
	Summe	<b>355</b>

### 3.3. QTL-Analyse zur quantitativen Resistenz gegen *P. infestans*

Aufbauend auf den SNPs und Indels in RGL-Kandidatenregionen (Kap. 3.1.) und die Erkenntnisse zur quantitativen Genotypisierung (Kap. 3.2.) nutzend, wurde eine QTL-Analyse der quantitativen Resistenz gegen *P. infestans* in zwei tetraploiden Kreuzungspopulationen durchgeführt.

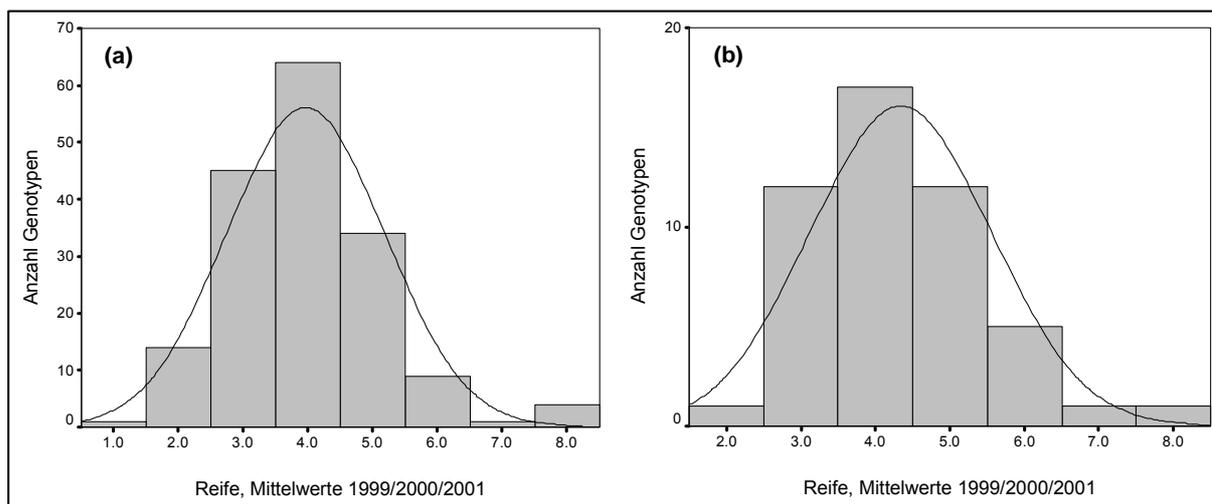
#### 3.3.1. Untersuchungspopulation

Für QTL-Analysen wurden die phänotypischen Daten und die Genotypisierungsdaten in den F1-Hybrid-Populationen aus den Kreuzungen Nikita x Leyla (93 Individuen) und Escort x Leyla (79 Individuen) erhoben (Kap. 2.6.1.). Auf der Basis der Evaluierungsdaten des Jahres 2001 bezüglich der Resistenz wurden aus beiden F1-Populationen Individuen mit extremen Resistenzwerten für die *cases* und *controls* Population ausgewählt. In dieser Gruppe befanden sich 14 resistente und 20 anfällige Pflanzen aus der Kreuzung Nikita x Leyla und 14 resistente und 1 anfällige Pflanze aus der Kreuzung Escort x Leyla. Insgesamt wurde die QTL-Analyse mit fünf Untersuchungsgruppen durchgeführt; mit den beiden kompletten F1-Populationen, mit den beiden F1-Populationen gemeinsam, mit den *cases* und *controls* aus der Kreuzung Nikita x Leyla und den *cases* und *controls* aus beiden Populationen.

#### 3.3.2. Phänotypische Daten

Die phänotypischen Daten aus den Feldversuchen in Windeby wurden von der Firma Saka-Ragis Pflanzenzucht GbR in Windeby zur Verfügung gestellt.

**Reifewerte.** Die Daten zur Reifezeit wurden in den Jahren 1999, 2000 und 2001 mit einer Skala von 1 bis 9 (Frühreif bis Spätreif) bewertet. Die Reifewerte wurden direkt zur statistischen Auswertung herangezogen. Das phänotypische Merkmal zeigte eine quantitative Ausprägung (Abb. 3-26). Die Mittelwerte variierten in den drei Jahren bei der Nikita x Leyla Population zwischen 3,6 und 4,6 und bei der Escort x Leyla Population zwischen 3,6 und 4,2. Für die QTL-Analyse wurde aus den drei Jahren das arithmetische Mittel berechnet. Diese Datenreihe zeigte in keiner Untersuchungsgruppe eine Normalverteilung, so dass nicht-parametrische Tests (Mann-Whitney-U-Test bzw. Kruskal-Wallis-Tests) angewandt werden mussten.



**Abb. 3-26:** Verteilung der aus den Jahren 1999, 2000 und 2001 gemittelten Reifedaten (a) bei den Genotypen der beiden gesamten F1-Populationen aus den Kreuzungen Nikita x Leyla und Escort x Leyla und (b) in der Untersuchungspopulation bestehend aus den *cases* und *controls*. Je höher die Reifewerte, desto später erfolgte die Reifung. Bei den eingezeichneten Kurven handelt es sich um die Normalverteilungskurven; bei beiden gezeigten Datenreihen wurde eine Normalverteilung abgelehnt ( $P < 0,20$ ).

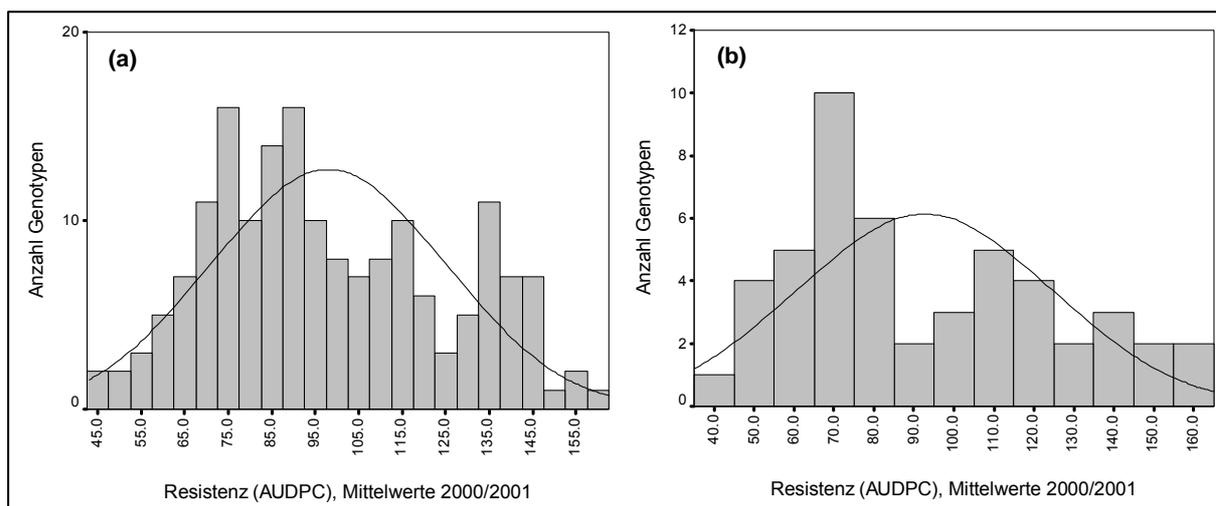
**Resistenzwerte (AUDPC).** Die Bonituren zur Resistenz wurden in den Jahren 2000 und 2001 an jeweils 9 verschiedenen Tagen im Feld erhoben (z.B. Abb. 3-27). Beim Vergleich



**Abb. 3-27:** Quantitativ resistente (links; Bonitur: 1) und anfällige (rechts; Bonitur: 9) Pflanzen der Nikita x Leyla Population 15 Tage nach der Infektion mit *P. infestans* im Feldversuch.

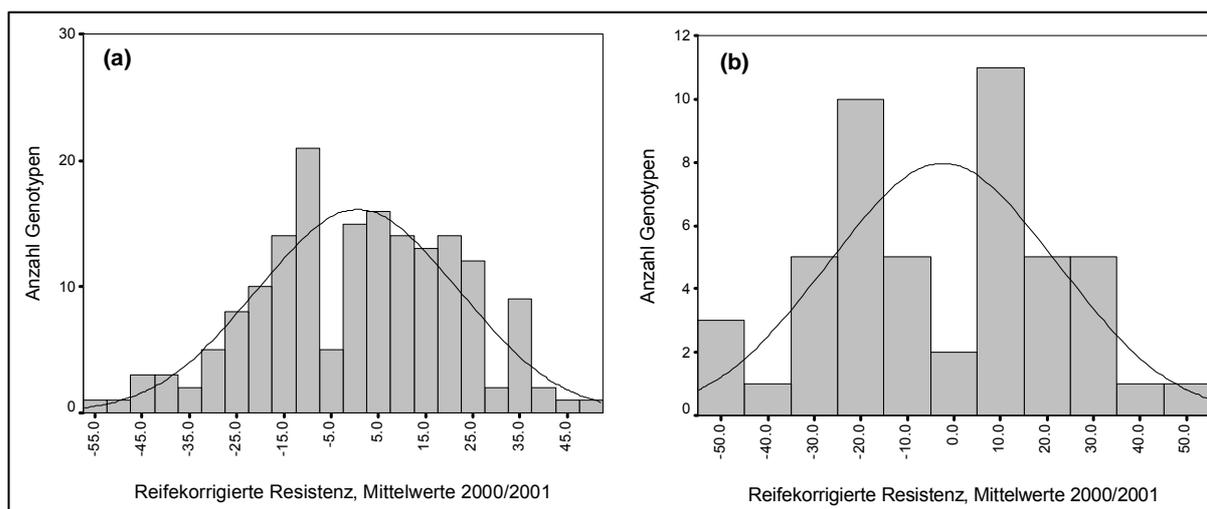
zwischen den Jahren wurden teilweise unterschiedliche Bewertungen offensichtlich (Daten nicht gezeigt). Um Resistenzwerte unter Berücksichtigung des Befallsverlaufes zu ermitteln, wurden mit diesen Boniturdaten AUDPC-Resistenzwerte (Jeger und Viljanen-Rollinson, 2001) berechnet. Die Daten zu diesem Zielmerkmal zeigten, wie erwartet, eine quantitative Merkmalsausprägung (Abb. 3-28). Auf Grundlage der Daten aus den beiden Jahren wurde das arithmetische Mittel als

weiterer Datensatz ermittelt. Die Datensätze wurden getrennt für die verschiedenen Untersuchungspopulationen auf Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstests, Signifikanzniveau  $P \leq 0,20$ ) getestet. Dabei zeigten die AUDPC-Resistenzwerte des Jahres 2001 in der Population Nikita x Leyla und in der Untersuchungsgruppe mit beiden F1-Populationen keine Normalverteilungen, so dass bei diesen Daten nicht-parametrische Tests (Mann-Whitney-U-Test bzw. Kruskal-Wallis-Tests) angewandt werden mussten; alle anderen Datenreihen waren normalverteilt.



**Abb. 3-28: Verteilung der aus den Jahren 2000 und 2001 gemittelten quantitativen Resistenz (AUDPC-Werte) (a) bei den Genotypen der beiden gesamten F1-Populationen aus den Kreuzungen Nikita x Leyla und Escort x Leyla und (b) in der Untersuchungspopulation bestehend aus den cases und controls. Mit zunehmender Größe der AUDPC-Wert nimmt die Resistenz ab. Bei den eingezeichneten Kurven handelt es sich um die Normalverteilungskurven; die beiden dargestellten Datenreihen waren normalverteilt ( $P > 0,20$ ).**

**Reifekorrigierte Resistenzwerte.** Da die Reifeentwicklung die Resistenz beeinflusst (Fry und Apple, 1986), wurden reifekorrigierte Resistenzwerte ermittelt. Dazu wurde zunächst eine Regressionsgerade zwischen den AUDPC-Resistenzdaten und den Reifedaten berechnet. Die reifekorrigierten Resistenzdaten ergaben sich dann aus den Differenzen zwischen den einzelnen AUDPC-Werten und der Regressionsgeraden, dabei weisen anfällige Pflanzen positive Werte und resistente Pflanzen negative Werte auf. Die Mittelwerte der Nikita x Leyla Population lagen bei 0,00 (2000) und 1,91 (2001) und die einzelnen Werte streuten zwischen -83,75 und +65,19 (2000) und -86,93 und +51,27 (2001). Bei der Escort x Leyla Population lagen die Mittelwerte bei 0,49 (2000) und 0,01 (2001) und eine Streuung zwischen -58,71 und +75,54 (2000) bzw. -36,99 und +50,52 (2001) konnte festgestellt werden. Als dritter Datensatz wurde das arithmetische Mittel aus den beiden Jahren ermittelt (Abb. 3-29). Lediglich die Werte der Population Nikita x Leyla für das Jahr 2001 wiesen keine Normalverteilung auf, so dass alle anderen Datensätze mit parametrischen Tests (ANOVA) analysiert werden konnten.

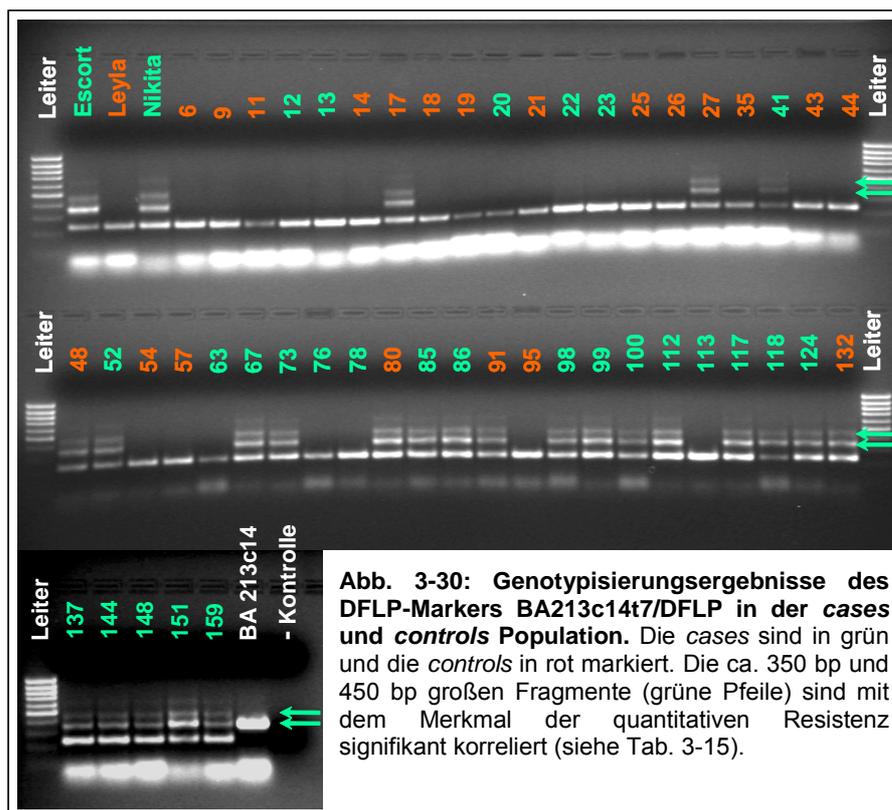


**Abb. 3-29: Verteilung der aus den Jahren 2000 und 2001 gemittelten reifekorreigierte Resistenz (a) bei den Genotypen der beiden F1-Populationen aus den Kreuzungen Nikita x Leyla und Escort x Leyla und (b) in der Untersuchungspopulation bestehend aus den cases und controls.** Bei den negativen Resistenzwerten handelt es sich um resistente Pflanzen und bei den positiven Resistenzwerten um anfällige Genotypen. Eingezeichnet sind die Normalverteilungskurven; beide Datenreihen waren normalverteilt ( $P > 0,20$ ).

### 3.3.3. Genotypisierungsdaten

**Analysierte Polymorphismen.** Aus der erstellten Datenbank über Polymorphismen in RGL- und Markerregionen (Kap. 3.1.) wurden für die QTL-Analyse 89 Marker (84 SNPs, 3 Indels, 2 DFLP; Tab. 9-2, Tab. 9-3) ausgewählt, welche in den Eltern der Untersuchungspopulationen heterozygot vorlagen und somit in der F1 Generation segregieren sollten. Mit den Methoden *BigDye-Sequencing*, *Minisequencing*, *Pyrosequencing* (Kap. 3.2.) konnten insgesamt 70 Polymorphismen (67 SNPs, 2 Indels, 2 DFLP; Tab. 9-12) quantitativ und 1 DFLP-Marker (213c14t7/DFLP) qualitativ mit allelspezifischer PCR (Abb. 3-30) erfolgreich genotypisiert werden. Diese Polymorphismen gehen auf 22 RGL-Kandidatenregionen und 12 bekannte Markersequenzen zurück. Hierdurch war jedes der 12 Chromosomen (= Kopplungsgruppen = KG) mit wenigstens einem Marker repräsentiert (Abb. 3-30). Zunächst wurden die Genotypisierungsdaten für alle Polymorphismen in den cases und controls (Kap. 3.3.1.) ermittelt. Marker, welche in diesen Teilpopulationen Korrelationen mit dem Zielmerkmal der quantitativen Resistenz gegen *P. infestans* aufwiesen (Kap. 3.3.4.; Tab. 3-15), wurden dann ergänzend in den gesamten F1-Populationen genotypisiert (22 Marker in der Nikita x Leyla Population, 15 Marker in der Escort x Leyla Population).

Bei 5 SNPs entsprachen die ermittelten Allelverhältnisse nicht den erwarteten 25%-Schritten eines SNPs in tetraploiden Genomen. Stattdessen konnten 12,5%-Abstufungen bei den SNPs BA261b9t7/174, s1d11/183 und s1d11/186, etwa 8%-Schritte bei dem SNP CP105/144 und etwa 6%-Schritte bei dem SNP BA113a17t3/200 gemessen werden.



### 3.3.4. QTL-Analyse

#### 3.3.4.1. Korrelationsanalyse

Bei den Korrelationsanalysen wurden die phänotypischen Daten (Kap. 3.3.2.) mit den Genotypisierungsergebnissen (Kap. 3.3.3.) in den verschiedenen Untersuchungsgruppen (Kap. 3.3.1.) korreliert. Dabei zeigte sich, dass 5 der insgesamt 71 Marker identische Segregationsmuster aufwiesen und somit keine zusätzlichen Informationen lieferten (Tab. 3-15). Bei den Polymorphismen, welche in der F1-Generation mit mehr als zwei verschiedenen Allelverhältnissen auftraten, wurden in den Korrelationsanalysen sowohl alle Genotypen gegeneinander getestet, als auch Genotypen zu Gruppen zusammengefasst und analysiert (genauere Erläuterung siehe Kap. 2.6.3.).

22 Marker wurden nicht nur in den cases und controls der Kreuzungspopulationen, sondern in allen F1-Individuen genotypisiert. Hierbei zeigte sich, dass mit der cases-und-controls-Gruppe ermittelte Korrelationseffekte auch bei der Analyse der gesamten F1-Populationen festgestellt wurden (Tab. 3-15). Beim Vergleich der konkreten *P*-Werte werden bei den verschiedenen Gruppen teilweise unterschiedliche Signifikanzniveaus erreicht, allerdings ist dabei kein gemeinsamer Trend zu beobachten; so sind sowohl Marker auszumachen, bei denen signifikantere Korrelationen mit der cases-und-controls-Gruppe berechnet wurden (z.B. BA76o11t3/310), als auch Marker, bei denen mit der gesamten F1-Population deutlichere Korrelationeneffekte ermittelt wurden (z.B. BA213c14t7/253). Bezüglich der  $R^2$ -

Werte ist allerdings durchgängig bei allen Analysen ein deutlicher Unterschied dahingehend festzustellen, dass der  $R^2$ -Wert bei der kleineren Untersuchungsgruppe zwischen 1 % (= 9 % relativer Unterschied; bei BA213c14t7/253) und 23 % (= 328 % relativer Unterschied; bei BA76o11t7/186) größer war als bei der gesamten F1-Population.

Von den 71 segregierenden Polymorphismen (Gesamtübersicht Tab. 9-12) zeigten insgesamt 35 mit wenigstens einer der phänotypischen Datenreihen bei mindestens einer Untersuchungspopulation signifikante Korrelationen (Tab. 3-15).

**QTLs für Reife.** Insgesamt wurden 6 Loci auf den Chromosomen I, III, V, VI, IX und X mit signifikantem Einfluss auf das quantitative Merkmal der Reife identifiziert (Tab. 3-15, Abb. 3-31). Dabei zeigte der Locus auf KG V den deutlich stärksten Effekt. Alle Marker in diesem Genomabschnitt korrelierten signifikant in der Nikita x Leyla Population, dabei waren die deutlichsten Effekte ( $P < 0,0001$ ) bei den SNPs BA132h9t3/317, BA213c14t3/268, BA213c14t7/253, BA213c14t7/452 und BA87d17t3/109 zu beobachten. Die Effekte auf Chromosom V waren in der Population Nikita x Leyla und bei der gemeinsamen Analyse beider Kreuzungspopulationen zu beobachten, in der Escort x Leyla Population allein allerdings lediglich mit schwacher Signifikanz ( $P < 0,05$ ) bei BA213c14t7/253. Auch bei den auf den anderen Kopplungsgruppen detektierten QTLs, welche generell schwächere Unterstützungswerte aufwiesen ( $P < 0,05$  bzw.  $P < 0,01$  bei BA1m23t3/28 auf KG VI), waren die Effekte nicht bei alleiniger Untersuchung der Escort x Leyla Population auszumachen. Ausnahmen bildeten ein QTL auf Chromosom III (4CL/228) und ein QTL auf KG X (BA113a17t3/200), welcher nur bei Escort x Lelya zu identifizieren war. Beim Vergleich mit den Korrelationsanalysen der Resistenzdaten fällt auf, dass lediglich ein einziger Locus, CP135 auf KG IX, ausschließlich ein QTL für Reife ist; alle anderen Loci für das Merkmal der Reife zeigten auch Korrelationen mit der Resistenz (siehe unten; Abb. 3-31).

**QTLs für Resistenz gegen *P. infestans*.** Es wurden 13 verschiedene Loci auf 10 Chromosomen (I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, X und XII) mit signifikantem Einfluss auf die quantitative Resistenz detektiert (Tab. 3-15; Abb. 3-31). Auf den Kopplungsgruppen I mit BA62l7t3/463, VI mit BA1m23t3/28, VIII mit BA73e8t3/65, X mit BA63o3t7/228 und mit GP266/158 und XII mit BA106h21t3/74 konnten, teilweise hochsignifikant, Effekte durchgängig in beiden Testjahren und im Durchschnitt beider Jahre festgestellt werden. Da all diese Polymorphismen ausschließlich in den *cases* und *controls* untersucht wurden, sind keine Aussagen zu der Escort x Leyla Population möglich. Wie schon bei der Reife wurden die deutlichsten Korrelationen mit den Markern auf Chromosom V identifiziert, allerdings vorrangig für die Nikita x Leyla Population und mit nur schwachen Signifikanzen in der Escort x Leyla Population (BA76o11t7/186, BA129o7t7/247, BA213c14t7/353).

**QTLs für reifekorrigierte Resistenz gegen *P. infestans*.** Die dieser Korrelationsanalyse zugrunde liegende Datenreihe basiert auf den phänotypischen Erhebung zur Reife und Resistenz.

Insgesamt wurden 10 Loci auf 8 Chromosomen (I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII und X) mit signifikanten Effekten auf die reifekorrigierte Resistenz identifiziert (Tab. 3-15, Abb. 3-31). Bei Anwendung der Kriterien Kontinuität über der Testjahre, Signifikanzniveau und  $R^2$ -Wert erwiesen sich als besonders dominant in der Nikita x Leyla Population bzw. in beiden Populationen gemeinsam die zwei physikalisch nahe zusammen liegenden Loci auf Chromosom II (mit St3.1/204 und GP205/1090 bzw. GP 3/271), die Region auf KG V (mit BA87d17t3/109, BA132h9t3/317, BA213c14t7/253) und der QTL auf KG VIII (mit BA73e8t3/65). Es fällt allerdings wiederum besonders die *hot spot* Region auf Chromosom V auf. Eine Betrachtung der physikalischen Anordnung der korrelierten Effekte in dieser *hot spot* Region auf Grundlage der feinkartierten BACs (Abb. 3-2) zeigte, dass Marker in der physikalischen Nähe des *R1*-Gens (BA76o11t3, BA87d17t3) stärkere Effekte auf das Zielmerkmal aufwiesen, als entferntere Polymorphismen (z.B. 47f2t3).

Bei einem Vergleich der Segregationsmuster der untersuchten SNPs in dem 270 kb großen Abschnitt des Contigs zwischen BAC-Enden BA47f2t3 und BA87d17t7 zeigte sich, dass lediglich 3 SNPs identische Verteilungen in der F1-Generation mit jeweils einem anderen SNP aufwiesen (BA129o7t7/247=BA132h9t3/157, BA213c14T3/268 =BA213c14T3/286, BA213c14T7/273=BA213c14T7/452). Alle anderen SNPs dieser Region segregierten unterschiedlich und könnten somit unterschiedliche homologe Chromosomen repräsentieren.

Interessant ist ein Vergleich der QTLs für die reifekorrigierte Resistenz mit den Ergebnissen der beiden anderen Datenreihen (s.o.). Erwartungsgemäß fielen alle QTLs für die reifekorrigierte Resistenz auch bei den Korrelationsanalysen mit den unkorrigierten Resistenzdaten auf. Allerdings erwiesen sich die Loci BA9i23t7 auf KG IV, GP266 auf KG X und BA106h21 auf KG XII nicht als QTLs für die reifekorrigierte Resistenz, obwohl diese Effekte bei der unkorrigierten Resistenz, nicht aber signifikante Korrelationen mit der Reife gezeigt hatten. Anders verhielten sich die beiden Loci auf Chromosom II, (St3.1/204 und GP205/1090 bzw. GP23/271), ein Locus auf III (GP25/In63), der untersuchte Locus auf VII (BA228g19t7/70) und ein Locus auf VIII (BA73e8/65). Bei diesen Loci waren lediglich Korrelationen mit den AUDPC-Resistenzwerten und keine mit den Reifedaten detektiert worden. Ein ähnlicher Zusammenhang zwischen den verschiedenen phänotypischen Daten zeigte sich bei dem QTL BA76o11t3 auf KG V; es wurde nur ein schwacher Reifeeffekt, aber starke Effekte mit beiden Resistenzdatenreihen berechnet. Ein umgekehrter Zusammenhang zeigte sich bei den Polymorphismen BA76o11t7/144 und BA87d17t3/146; denn an diesem Loci konnten starke Effekte der Reife und Korrelationen mit der

unkorrigierten Resistenz festgestellt werden, aber kein Einfluss auf die reifekorrigierte Resistenz. Schließlich gab es Loci, die bei allen drei Datenreihen starke Korrelationen zeigten (BA87d17t3/109, BA132h9t3/317).

**Dosiseffekt.** Bei insgesamt 4 Markern (BA62l7t3/463, BA87d17t3/109, BA76o11t3/286, BA76o11t3/310) konnte ein Dosiseffekt beobachtet werden, d. h., dass der Einfluss des QTLs auf das untersuchte Merkmal abhängig von der im individuellen Genotyp vorhandenen Alleldosis ist. Diese Beobachtung sei beispielsweise an dem SNP BA76o11t3/286 bezüglich der reifekorrigierten Resistenz ausführlicher erläutert (Tab. 3-13). In der Nikita x Leyla Population (GGCC x GGGC) kam dieser binäre C-G-SNP in 4 verschiedenen Allelkompositionen vor (GGGG, CGGG, CCGG, CCCG). Beim Testen aller Genotypen gegeneinander zeigte sich bereits eine signifikante Korrelation. Wurden nun die homozygoten G-Genotypen gegen die Genotypen mit C-Allel, unabhängig davon, wie häufig dieses Allel vorhanden war, getestet, gab es keine signifikante Korrelation mehr. Auch konnte kein signifikanter Unterschied beim Test der Genotyps ohne C zusammen mit demjenigen mit einem C-Allel gegen jene mit 2 oder 3 C-Allelen ausgemacht werden. Erst ab einer Dosis von 3 C-Kopien getestet gegen die restlichen Genotypen war eine hochsignifikante Korrelation mit dem Zielmerkmal zu ermitteln. Dieser Dosiseffekt wurde auch durch die ermittelten durchschnittlichen Resistenzwerte bestätigt. So ist das C-Allel negativ mit dem Zielmerkmal korreliert und die Resistenz nimmt mit der Anzahl dieses Allels ab, so dass der Genotyp mit drei Kopien im Vergleich zu den anderen Dosen hochanfällig ist; und entsprechend gegenläufig ist der Einfluss des G-Allels.

**Tab. 3-13: Dosisabhängiger Einfluss des Marker BA76o11t3/268 auf die reifekorrigierte Resistenz bei der Nikita x Leyla Population (GGCC x GGGC).** In (a) sind die Ergebnisse der Korrelationsanalysen gezeigt. Es wurden sowohl alle Genotypgruppen gegeneinander (<>) getestet, als auch Genotypen zu Gruppen zusammengefasst und diese gegeneinander getestet. In (b) sind für die 4 verschiedenen Allelverhältnisse die durchschnittlichen reifekorrigierten Resistenzwerte aufgeführt. Bei den negativen Resistenzwerten handelt es sich um resistente Genotypen und bei den positiven Resistenzwerten um anfällige Genotypen. Alle Angaben beziehen sich auf die gemittelten Daten auf den Jahren 2000 und 2001

(a)	gegeneinander getestete Genotypen	Resistenz (reifekorrigiert)	
		P	R <sup>2</sup> [%]
	GGGG <> CGGG <> CCGG <> CCCG	0.0351*	10
	GGGG <> CGGG + CCGG + CCCG	0.150	2
	GGGG + CGGG <> CCGG + CCCG	0.054	4
	GGGG + CGGG + CCGG <> CCCG	0.0039**	9
(b)	Genotyp (N)	durchschnittliche Resistenz (reifekorrigiert)	
	GGGG (15)	-7.5	
	CGGG (26)	-3.0	
	CCGG (17)	-4.4	
	CCCG (29)	11.0	

**Tri-allelische SNPs.** Im Rahmen der QTL-Analyse wurden 2 tri-allelische SNPs analysiert (GP23/271, BA87d17t3/109). In beiden Fällen zeigten sich Korrelationen mit den Zielmerkmalen (Tab. 3-13). Da der SNP BA87d17t3/109, welcher lediglich in der Nikita x Lelya Population segregierte, bei den Analysen eine besonders dominierende Rolle offenbarte, sei hierfür eine genauere Betrachtung für die reifekorrigierte Resistenz vorgenommen (Tab. 3-14-a). Zunächst wurden alle Genotypen gegeneinander getestet und es zeigten sich hochsignifikante Korrelationen. Bei den Analysen nach verschiedenen Gruppenbildungen mit den Genotypklassen zeigten sich zwei signifikante Effekte. Zum einen gab es signifikante Korrelationen beim Vergleich der Genotypen, welche gleichzeitig T- und C-Allele besaßen mit denen, welche sowohl G-, als auch C-Allele trugen; zum anderen erwies sich die Gegenüberstellung des Genotyps mit G- und C-Allel, aber ohne T-Allel gegen die Genotypen mit T-Allel als hochsignifikant. Die Genotypen mit dem T-Allel erwiesen sich als resistente Pflanzen, wobei die durchschnittliche Resistenz bei 2 Kopien deutlich zunahm, und entsprechend wiesen die Resistenzdaten den Genotyp ohne T-Allel als anfällig aus (Tab. 3-14-b).

**Tab. 3-14: QTL-Effekte des tri-allelischen Markers BA87d17t3/109 auf die reifekorrigierte Resistenz bei der Nikita x Lelya Population (GCTT x CCCC).** In (a) sind die Ergebnisse der Korrelationsanalysen gezeigt. Es wurden sowohl alle Genotypgruppen gegeneinander (<>) getestet, als auch Genotypen zu Gruppen zusammengefasst und diese gegeneinander getestet. In (b) sind für die 4 verschiedenen Allelkompositionen die durchschnittlichen reifekorrigierten Resistenzwerte aufgeführt. Bei den negativen Resistenzwerten handelt es sich um resistente Genotypen und bei den positiven Resistenzwerten um anfällige Genotypen. Alle Angaben beziehen sich auf die gemittelten Daten aus den Jahren 2000 und 2001.

(a)	gegeneinander getestete Genotypen	Resistenz (reifekorrigiert)	
		<i>P</i>	R <sup>2</sup> [%]
	TCCC <> TTCC <> GTCC <> GCCC	0.000****	20
	TCCC + TTCC <> GTCC <> GCCC	0.001***	17
	TCCC + TTCC <> GTCC + GCCC	0.126	2
	TCCC + TTCC + GCCC <> GTCCC	0.081	4
	TCCC + TTCC + GTCC <> GCCC	0.000****	15
(b)	Genotyp (N)	durchschnittliche Resistenz (reifekorrigiert)	
	TTCC (8)	-22	
	TCCC (36)	-1	
	TGCC (22)	-7	
	GCCC (21)	17	

### 3.3.4.2. Regressionsanalyse

Alle Polymorphismen, welche signifikante Effekte bei den Korrelationsanalysen gezeigt hatten, wurden in einer multiplen Regressionsanalyse genutzt. Bei dieser Berechnung wird in jedem Schritt derjenige Marker (unabhängige Variable) ausgewählt, welcher den signifikantesten Effekt auf die phänotypischen Daten (abhängige Variable) hat und anschließend in dem Regressionmodell behalten. Diese Auswahl von Markern wird solange fortgesetzt, bis kein

weiteren Marker mit signifikant ( $P < 0,05$ ) neuem Informationsgehalt für das Zielmerkmal identifiziert werden kann. Schließlich wird für jeden Marker ein Parameter (PA) geschätzt ( $a, b, c, \dots$ ) mit welchem der Marker in das multiple Regressionmodell  $y = a + bx_1 + cx_2 + \dots$  eingeht. In diesem Regressionsmodell entspricht  $y$  dem phänotypischen Wert und  $x_n$  den Genotypisierungsdaten.

Insgesamt bestätigten die Ergebnisse der Regressionanalysen (Tab. 3-16) die Effekte der Korrelationsanalysen (Kap. 3.3.4.1.).

**Regressionsmodell zur Beschreibung der Reife.** Bei separater Untersuchung der Escort x Leyla Population blieb nur ein Marker auf Chromosom III (4CL/228) übrig, mit welchem lediglich 8% der phänotypischen Varianz ( $R^2$ ) erklärt werden konnten. Bei allen anderen Untersuchungsgruppen fanden sich in den Modellen Marker von dem QTL auf Chromosom V. So wurden allein mit dem hochsignifikanten ( $P < 0,0001$ ) Marker BA213c14t3/268 im Regressionsmodell für die komplette Nikita x Leyla Population schon 30% der phänotypischen Varianz erklärt; in der Gruppe von *cases* und *controls* wurde dieser Marker durch einen weiteren aus der gleichen *hot spot* Region mit anderem Segregationsmuster (BA87d17t3/109) ergänzt und zusammen ein hochsignifikantes Modell ( $P < 0,0001$ ) mit einem  $R^2$ -Wert von 67% erreicht. In den gemeinsamen Untersuchungen der Populationen zeigte sich noch ergänzend zu den Loci auf KG III und V ein Einfluss von Chromosom II mit St3.2/157.

**Regressionsmodell zur Beschreibung der Resistenz gegen *P. infestans*.** Auch bei diesem Merkmal waren die Berechnungen für die Escort x Leyla Population allein wenig aussagekräftig. So konnte für das Jahr 2000 kein signifikantes Modell erstellt werden und für das Jahr 2001 und bei der gemeinsamen Untersuchung beider Jahre konnten nur schwach signifikante Modelle ( $P < 0,05$ ) mit niedrigen  $R^2$ -Werten (7% bzw. 8%) mit nur einem Marker von Chromosom V ermittelt werden. In den anderen Untersuchungsgruppen konnten durchgängig für beide Jahre, getrennt und gemeinsam analysiert, hochsignifikante ( $P < 0,0001$ ) Modelle mit einem bis maximal 4 Markern kalkuliert werden. Immer waren an der Erklärung der quantitativen Resistenz Marker von dem QTL auf KG V beteiligt. So konnten beispielsweise bei der Nikita x Leyla Population bzw. in beiden F1-Populationen gemeinsam 55% bzw. 56% der phänotypischen Varianz des Zielmerkmals im Jahr 2001 durch die Kombination von 4 Markern dieses dominierenden QTLs erklärt werden. Weitere Marker von den Kopplungsgruppen I, II, III, VII, X und XII gingen in einzelne Modelle zur Beschreibung des Merkmals ein, allerdings wurde keiner dieser QTLs durchgängig bei allen Gruppen bzw. in allen Jahren genutzt.

**Regressionsmodell zur Beschreibung der reifekorrigierten Resistenz gegen *P. infestans*.** Im Rahmen der Regressionsanalysen zur reifekorrigierten Resistenz konnte kein signifikantes Modell bei der Escort x Leyla Population kalkuliert werden. Für die anderen

Untersuchungsgruppen konnten wiederum hochsignifikante ( $P < 0,0001$ ) Modelle mit einem bis 4 Markern erstellt werden. Die in die Beschreibungen der reifekorrigierten Resistenz eingegangenen Marker stammen von QTLs auf den Chromosomen I, II, V, VII, X und XII: Hierbei handelt es sich, mit Ausnahme des QTLs auf III, um die gleichen Loci, welche auch bei der unkorrigierten Resistenz genutzt worden waren. Im Vergleich zeigte sich hier allerdings deutlicher der Einfluss der beiden QTLs auf der Kopplungsgruppe II (St.3.1 und St.3.2; GP23). So waren beispielsweise durch eine Kombination dieser beiden Loci mit dem Marker BA132h9t3/317 von KG V im Mittel der beiden Testjahre bei der Nikita x Leyla Population bzw. in beiden F1-Populationen gemeinsam 30% bzw. 29% der phänotypischen Varianz erklärbar. Als konstant dominierender Locus erwies sich allerdings erneut der QTL auf Chromosom V. Wiederum ist ein Vergleich der Regressionsanalysen mit den verschiedenen phänotypischen Datenreihen, insbesondere für die Region auf KG V, aufschlussreich. Beispielsweise wurden für das Jahr 2001 in der Nikita x Leyla Population bzw. in beiden F1-Populationen Modelle für die reifekorrigierte und die unkorrigierte Resistenz mit jeweils einer Kombination aus 4 Markern (davon 3 identisch) auf KG V berechnet. Die Marker erklären allerdings nur 41% bzw. 40% der phänotypischen Varianz bei der reifekorrigierten Resistenz, während bei der unkorrigierten Resistenz hiermit 55% bzw. 56% beschrieben werden konnten (s.o.).

**Tab. 3-15: Ergebnisse der Korrelationsanalysen zwischen den Genotypisierungsdaten und den phänotypischen Daten.** Bei den Evaluierungsdaten handelt es sich bei der Reife um den Mittelwert aus den Jahren 1999 bis 2001, bei den AUDPC-Resistenzwerten und der reifekorrigierten Resistenz wurden jeweils die Jahre 2000 und 2001 getrennt und gemeinsam analysiert. Bei den genotypischen Daten wurden sowohl alle beobachteten Allelkombinationen, als auch zusammengefasste Allelverteilungen gegeneinander getestet (siehe Kap. 2.7.3.). Die Korrelation wurde für folgende Populationen durchgeführt: NxL (c) = *cases* und *controls* Nikita x Leyla; NxL = F1 Nikita x Leyla; ExL = F1 Escort x Leyla; NxL + ExL (c) *cases* und *controls* der beiden Populationen; NxL + ExL = F1 der beiden Populationen. Es sind lediglich die Loci/Marker aufgeführt, die mindestens in einem Test signifikant zeigten. Die Festlegung der Signifikanzgrenzen erfolgten folgendermaßen: - =  $P \geq 0,05$ ; \* =  $P < 0,05$ ; \*\* =  $P < 0,01$ ; \*\*\* =  $P < 0,001$ ; \*\*\*\* =  $P < 0,0001$ . Bei den  $R^2$ -Angaben handelt es sich um %-Werte.

KG	Locus/Marker	Population	gegeneinander getestete Genotypen	Reife	Resistenz (AUDPC)			Reifekorrigierte Resistenz						
				MW	2000		2001	MW	2000		2001		MW	
				<i>P</i>	<i>P</i>	<i>P</i>	<i>P</i>	<i>P</i>	$R^2$	<i>P</i>	$R^2$	<i>P</i>	$R^2$	
I	BA62L7T3/463	NxL (c)	0<>1+2+3	-	-	-	-	-	-	-	-	*	12	
			0+1+2<>3	*	*	*	*	-	-	-	-	-	-	-
		NxL+ExL (c)	0+1+2<>3	-	-	*	*	-	-	-	-	-	-	
II	GP23/271	NxL (c)	A<>A+T<>A+C<>A+T+C	-	-	*	-	-	-	**	34	*	30	
			C	-	-	*	*	-	-	**	25	**	19	
			T	-	*	*	*	*	14	*	18	**	20	
		NxL	A<>A+T<>A+C<>A+T+C	-	-	-	-	-	-	*	11	*	11	
			C	-	-	-	*	*	6	**	10	**	10	
II	GP205/1090	NxL (c)	1<>2<>3	-	-	*	*	*	21	***	44	***	39	
			1+2<>3	-	-	**	*	*	15	***	34	***	30	
II	St3.1/204	NxL (c)	0<>1<>2	-	*	-	-	**	29	*	20	*	25	
			0<>1+2	-	*	-	-	**	24	-	-	*	12	
		NxL	0<>1<>2<>3	-	-	-	-	-	-	*	9	*	9	
			0<>1+2+3	-	-	-	-	*	6	-	-	-	-	
II	St3.2/157	NxL+ExL (c)	2<>3+4	-	-	-	-	-	*	10	-	-		
III	4CL/228 (=S1b3/143)	ExL	0<>1<>2	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
			0<>1+2	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
			0+1<>2	*	-	-	*	-	-	-	-	*	6	
		NxL+ExL (c)	0<>1	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	
			NxL+ExL	0<>1+2	-	*	-	*	-	-	-	-	-	-
III	GP25/ln63 (=GP25/167)	NxL (c)	2<>3<>4	-	-	-	-	*	23	-	-	*	22	
			2+3<>4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
			2<>3+4	-	-	-	-	*	16	-	-	*	16	

KG	Locus/Marker	Population	gegeneinander getestete Genotypen	Reife MW P	Resistenz (AUDPC)			Reifekorrigierte Resistenz					
					2000	2001	MW	2000		2001		MW	
					P	P	P	P	R <sup>2</sup>	P	R <sup>2</sup>	P	R <sup>2</sup>
III	GP25/In63	NxL+ExL (c)	2<>3<>4	-	-	-	-	-	-	-	-	*	14
			2<>3+4	-	-	*	*	*	11	*	9	**	14
IV	BA9I23T7/230	NxL (c)	2<>3<>4	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-
			2<>3+4	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-
V	BA76O11T3/286	NxL (c)	0<>1<>2<>3	-	-	*	*	**	34	-	-	**	32
			0+1<>2+3	-	-	-	-	**	28	-	-	**	22
			0+1+2<>3	*	*	**	**	**	30	*	18	**	30
		NxL	0<>1<>2<>3	-	-	-	-	*	12	-	-	*	10
			0+1<>2+3	-	-	-	-	*	7	-	-	-	-
			0+1+2<>3	-	*	-	-	**	12	-	-	**	9
		NxL+ExL	0+1<>2+3	-	**	****	**	**	5	-	-	**	5
			0+1+2<>3	-	**	****	**	**	5	-	-	**	5
V	BA76O11T3/310	NxL (c)	0<>1<>2	-	*	**	**	***	37	*	21	***	36
			0<>1+2	-	-	-	-	***	30	*	13	**	27
			0+1<>2	*	*	**	**	**	29	**	20	***	31
		NxL	0<>1<>2	-	*	*	*	**	11	-	-	*	9
			0<>1+2	-	-	-	-	**	8	-	-	*	5
			0+1<>2	-	**	*	*	**	11	-	-	*	9
V	BA76O11T7/144	NxL (c)	3<>4	-	*	*	*	-	-	-	-	-	
		NxL+ExL (c)	3<>4	**	-	-	*	-	-	-	-	-	
V	BA76O11T7/178	NxL (c)	0<>1	**	**	***	****	***	40	**	33	****	48
		NxL+ExL (c)	0<>1	**	-	**	**	*	11	*	14	**	18
V	BA76O11T7/186	NxL (c)	0<>1	**	**	***	***	**	26	**	22	***	30
			NxL	0<>1	-	**	*	*	**	8	-	-	*
		NxL+ExL (c)	ExL	0<>1	-	-	*	**	-	-	-	-	-
			0<>1	**	-	**	**	*	10	*	11	**	14
V	BA87D17T3/109	NxL (c)	C+T<>G+C<>T+C<>T+G	***	**	**	***	*	31	-	-	*	32
			G	-	-	-	-	**	21	-	-	*	20
			T+G	**	**	*	**	-	-	-	-	-	-

KG	Locus/Marker	Population	gegeneinander getestete Genotypen	Reife MW P	Resistenz (AUDPC)			Reifekorreigierte Resistenz					
					2000	2001	MW	2000		2001		MW	
					P	P	P	P	R <sup>2</sup>	P	R <sup>2</sup>	P	R <sup>2</sup>
V	BA87D17T3/109	NxL (c) NxL	T	****	**	***	***	**	28	*	15	**	27
			C+T<>G+C<>T+C<>T+G	****	***	****	****	**	14	***	18	***	20
			G+T	****	*	****	****	-	-	*	5	-	-
			T	****	***	****	****	**	12	**	11	***	15
V	BA87D17T3/146	NxL (c) NxL+ExL (c)	0<>1	*	-	-	*	-	-	-	-	-	-
			0<>1	***	*	*	**	-	-	-	-	-	-
V	BA121O1T7/289	NxL (c)	0+1<>2+3+4	-	-	-	-	-	*	13	-	-	
V	BA129O7T7/247 (=BA132H9T3/157)	NxL (c) NxL ExL NxL+ExL (c)	0<>1	*	*	**	**	**	21	**	23	**	28
			0<>1	-	**	*	*	**	8	-	-	*	6
			0<>1	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-
			0<>1	**	-	*	*	-	-	*	11	*	13
V	BA132H9T3/317	NxL (c) NxL	0<>1<>2	**	**	***	**	**	33	*	19	**	31
			0<>1+2	**	***	**	***	***	32	*	12	**	27
			0<>1<>2	**	**	**	**	**	14	-	-	**	12
			0<>1+2	****	***	***	**	**	11	-	-	**	9
		NxL+ExL (c) NxL+ExL	0+1<>2	-	-	-	-	*	5	-	-	*	5
			0<>1<>2	**	**	**	***	**	24	*	16	**	26
			0<>1+2	**	**	**	***	***	24	*	9	***	23
			0<>1<>2	*	*	*	*	-	-	-	-	-	-
V	BA213C14T3/268 (=BA213C14T3/286)	NxL (c) NxL NxL+ExL (c) NxL + ExL	1<>2	**	**	**	***	-	-	*	14	-	-
			1<>2	****	***	****	****	-	-	***	16	**	11
			1<>2	***	*	***	***	-	-	**	16	*	10
			1<>2	****	*	****	****	-	-	***	9	**	6
V	BA213C14T7/253	NxL (c) NxL ExL NxL+ExL	1<>2	*	**	**	**	*	12	-	-	*	12
			1<>2	****	****	****	****	*	6	**	10	**	11
			0<>1<>2	*	*	**	**	-	-	-	-	-	-
			0<>1+2	-	*	*	*	-	-	-	-	*	6
			0+1<>2	-	-	*	*	-	-	-	-	-	-
			0+1<>2	****	**	**	****	*	3	***	7	**	6

KG	Locus/Marker	Population	gegeneinander getestete Genotypen	Reife	Resistenz (AUDPC)			Reifekorrigierte Resistenz						
				MW	2000		2001	2000		2001		MW		
				P	P	P	P	P	R <sup>2</sup>	P	R <sup>2</sup>	P	R <sup>2</sup>	
V	BA213C14T7/273 (=BA213C14T7/452)	NxL (c)	1<>2	**	**	**	**	-	-	-	-	-	-	
		NxL	1<>2	****	***	****	****	-	-	**	11	**	10	
		NxL + ExL	0<>1+2 0+1<>2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
				****	-	****	****	-	-	****	6	*	3	
V	BA213C14T7/DFLP	NxL+ExL (c)	0<>1	-	**	*	**	*	13	-	-	*	13	
VI	BA34J14T7/302	NxL+ExL (c)	0<>1<>2<>3<>4	*	-	*	*	-	-	-	-	-	-	
			0+1+2<>3+4	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
VI	BA1M23T3/28	NxL (c)	0<>1<>2	**	**	***	***	**	33	-	-	**	30	
			0+1<>2	*	**	**	**	*	14	-	-	-	-	
VI	BA1M23T3/90	NxL (c)	0<>1<>2	-	-	-	-	**	32	-	-	*	22	
VII	BA228G19T7/70	NxL (c)	3<>4	-	*	-	-	**	24	-	-	*	12	
			NxL	3<>4	-	-	-	-	*	5	-	-	-	-
VIII	BA73E8T3/65	NxL (c)	0<>1<>2	-	-	-	-	-	-	*	18	-	-	
			NxL+ExL (c)	0<>1<>2	-	**	*	*	**	20	*	14	**	22
				0+1<>2	-	***	**	**	**	20	*	8	**	20
IX	CP135/187	NxL+ExL (c)	0<>1<>2	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
			0<>1+2	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
X	BA63O3T7/228	NxL (c)	0<>1	*	*	-	*	-	-	-	-	-	-	
			NxL	0<>1	-	*	*	*	-	-	-	-	-	-
X	BA63O3T7/328	NxL (c)	2<>3<>4	-	-	-	-	*	18	-	-	-	-	
			2<>3+4	-	-	-	-	*	17	-	-	*	15	
X	BA113A17T3/200	NxL (c)	0<>1<>2<>3	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
			0+1<>2+3	*	-	*	-	-	-	-	-	-	-	
		NxL ExL	0<>1<>2<>3	-	-	-	-	-	-	*	10	-	-	
			0<>1<>2<>3<>4	*	-	-	-	-	-	*	19	-	-	
X	GP266/158	NxL+ExL (c)	0<>1	-	*	*	*	-	-	-	-	-		
XII	BA106H21T3/74	NxL+ExL (c)	0<>1	-	*	*	*	-	-	-	-	-		

**Tab. 3-16: Multiple Regressionsanalyse (mit Vorwärtsselektion).** Es wurden diejenigen Marker (mit allen Allelkompositionen, ohne Gruppenbildungen) bei der Regressionsanalyse berücksichtigt, welche bei der jeweiligen Population bezüglich des Merkmals einen signifikanten Effekt bei der Korrelationsanalyse gezeigt hatten (siehe Tab. X-X). Bei den Evaluierungsdaten handelt sich bei der Reife um den Mittelwert aus den Jahren 1999 bis 2001, bei den AUDPC-Resistenzwerten und den reifekorrigierten Resistenzwerten wurden jeweils die Jahre 2000 und 2001 getrennt und gemeinsam analysiert. Die Korrelation wurde für folgende Populationen durchgeführt: NxL (c) = *cases* und *controls* Nikita x Leyla; NxL = F1 Nikita x Leyla; ExL = F1 Escort x Leyla; NxL + ExL (c) *cases* und *controls* der beiden Populationen; NxL + ExL = F1 der beiden Populationen. Die Festlegung der Signifikanzgrenzen erfolgten folgendermaßen: - =  $P \geq 0,05$ ; \* =  $P < 0,05$ ; \*\* =  $P < 0,01$ ; \*\*\* =  $P < 0,001$ ; \*\*\*\* =  $P < 0,0001$ . Bei den R<sup>2</sup>-Angaben handelt es sich um %-Werte. Die abgeschätzten Parameter (PA) können in die Formel  $y = a + bx_1 + cx_2 + dx_3 + ex_4$  eingesetzt werden; dabei entspricht y dem phänotypischen Wert und x<sub>n</sub> den Genotypisierungswerten.

	Regression		a		b			c			d			e		
	P	R <sup>2</sup>	PA	P	Marker	PA	P	Marker	PA	P	Marker	PA	P	Marker	PA	P
Reife MW:																
NxL (c)	****	67	1	*	BA87D17T3/109	1	**	BA213C14T7/273	2	***						
NxL	****	30	2	****	BA213C14T3/268	2	****									
ExL	*	8	4	****	4CL/228	1	*									
NxL+ExL (c)	***	35	4	****	BA213C14T3/268	1	***	St3.2/157	-1	*						
NxL+ExL	****	42	2	***	BA132H9T3/317	1	*	BA213C14T3/268	1	****	4CL/228	1	*			
Resistenz (AUDPC) 2000:																
NxL (c)	***	59	-35	-	BA213C14T7/273	-39	*	BA228G19T7/70	47	***	BA76O11T3/310	28	*			
NxL	***	16	107	****	BA129O7T7/247	-36	***									
ExL	-	-														
NxL+ExL (c)	*	29	127	****	BA132H9T3/317	-28	**	4CL/228	-37	**						
NxL+ExL	****	25	126	****	BA132H9T3/317	-32	**	BA129O7T7/247	-23	*						
Resistenz (AUDPC) 2001:																
NxL (c)	****	85	108	****	BA62L7T3/463	-48	***	BA129O7T7/247	-31	****	GP23/271	13	**	BA1M23T3/28	-9	*
NxL	****	55	142	****	BA132H9T3/317	46	****	BA213C14T3/268	-75	****	BA87D17T3/109	19	****	BA213C14T7/273	-35	***
ExL	*	7	114	****	BA213C14T7/253	-15	*									
NxL+ExL (c)	****	44	152	****	BA213C14T3/268	-31	****	GP266/158	-20	**						
NxL+ExL	****	56	141	****	BA132H9T3/317	45	****	BA213C14T3/268	-75	****	BA87D17T3/109	19	****	BA213C14T7/273	-35	***

Regression		a			b			c			d			e		
P	R <sup>2</sup>	PA	P	Marker	PA	P										

Resistenz (AUDPC) MW:

NxL (c)	****	87	119	****	GP23/271	9	*	St3.1/204	-11	*	BA213C14T7/273	-30	***	BA76O11T3/310	39	****
NxL	****	40	146	****	BA213C14T3/268	-47	****	BA87D17T3/109	6	*						
ExL	*	8	108	****	BA213C14T7/253	-19	*									
NxL+ExL (c)	****	51	132	****	BA132H9T3/317	-27	***	GP266/158	-19	*	BA106H21T3/74	-24	**			
NxL+ExL	****	42	146	****	BA213C14T3/268	-38	****	BA76O11T3/310	10	**						

Reifekorregierte Resistenz 2000:

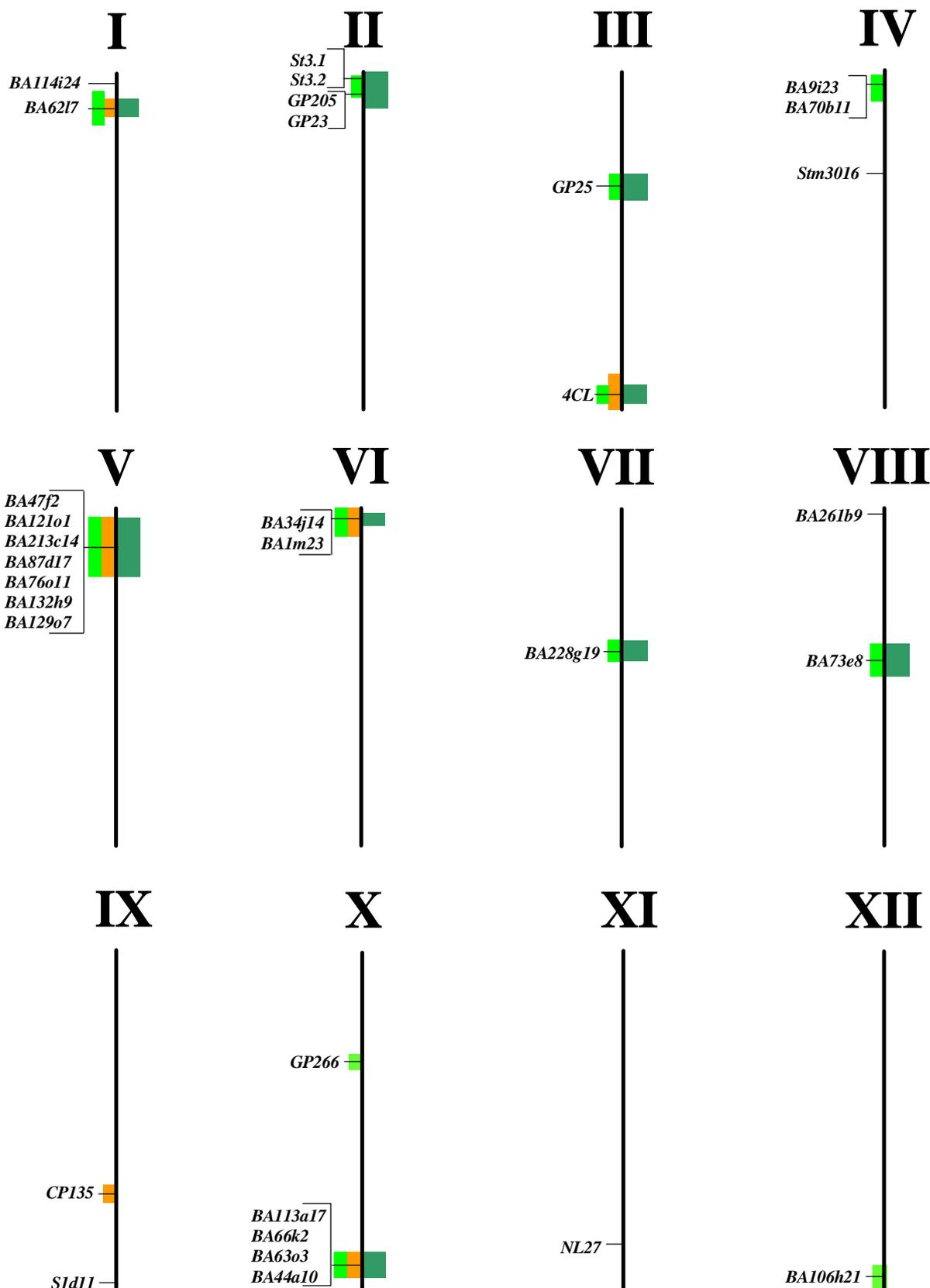
NxL (c)	****	74	-78	**	BA228G19T7/70	19	**	BA76O11T3/310	40	****						
NxL	****	33	21	*	BA76O11T3/286	26	****	BA213C14T7/273	-13	*	St3.1/204	-12	***			
ExL	-	-														
NxL+ExL (c)	****	43	31	***	BA132H9T3/317	-23	**	GP266/158	-18	*	BA106H21T3/74	-20	*			
NxL+ExL	****	37	-82	***	BA213C14T7/253	-16	**	BA228G19T7/70	16	**	GP23/271	7	*	BA76O11T3/310	14	****

Reifekorregierte Resistenz 2001:

NxL (c)	****	61	-3	-	BA62L7T3/463	14	**	BA76O11T3/310	8	**						
NxL	****	41	14	-	BA132H9T3/317	51	****	BA76O11T3/286	-75	****	BA87D17T3/109	21	****	BA213C14T7/273	-27	*
ExL	-	-														
NxL+ExL (c)	****	48	34	*	BA213C14T3/268	-36	****	St3.2/157	-10	*	BA213C14T7/273	33	**			
NxL+ExL	****	40	12	-	BA132H9T3/317	51	****	BA213C14T3/268	-73	****	BA87D17T3/109	21	****	BA213C14T7/273	26	*

Reifekorregierte Resistenz MW:

NxL (c)	****	79	2	-	BA62L7T3/463	-35	*	St3.1/204	-12	*	BA76O11T3/310	29	****			
NxL	****	30	14	*	BA132H9T3/317	-16	***	GP23/271	12	**	St3.1/204	-9	**			
ExL	-	-														
NxL+ExL (c)	****	56	27	****	BA132H9T3/317	-20	****	GP266/158	-17	**	BA106H21T3/74	-15	**			
NxL+ExL	****	29	2	-	BA132H9T3/317	-16	***	GP23/271	7	*	St3.1/204	-9	**			



**Abb. 3-31: Genetische Funktionskarte der Kartoffel zur quantitativen Resistenz gegen *P. infestans*.** Es sind alle Loci eingetragen, welche durch Marker in der QTL-Analyse repräsentiert waren. Im Rahmen der Korrelationsanalysen festgestellte signifikante QTLs für **Reife**, **Resistenz** (AUPDC-Werte) und **reifekorrigierte Resistenz** sind eingetragen; dabei spiegeln die Größen der Balken die relativen Stärken der QTL-Effekte wider bei Anwendung der Kriterien Kontinuität während der Testjahre, Signifikanzniveau und  $R^2$ -Wert (vergl. Tab. 3-13).

## 4. Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde mit einem neu entwickelten, SNP-basierten Markersystem die quantitative Resistenz gegen *P. infestans* bei der Kartoffel analysiert. Diese QTL-Analyse wurde auf der Grundlage und auf den Erkenntnissen von zwei weiteren Kernbereichen dieser Arbeit durchgeführt (Abb. 1-9). Zum einen mussten zunächst entsprechend der gewählten Strategie (*candidate gene approach*) bei der QTL-Analyse Kandidatenregionen (= RGLs) und dann in diesen vorkommende genetische Variationen, insbesondere SNPs, identifiziert werden. Zum anderen war es erforderlich, Genotypisierungsmethoden zu evaluieren und optimieren, so dass die QTL-Analyse unter Berücksichtigung des tetraploiden Genoms der Untersuchungspopulation durchgeführt werden konnte. Die Erkenntnisse der auf diesen Grundlagen aufbauenden QTL-Analyse geben direkte Einblicke in die genomweite Organisation der quantitativen Resistenz gegen *P. infestans*. Darüber hinausgehend dient diese Untersuchung aber auch als Beispiel für die Verwendung von SNPs bei der Analyse von Pathogenresistenzen.

### 4.1. Variabilität des Kartoffelgenoms in RGL-Regionen

**Genomische Organisation von RGL-Regionen.** In Säugetieren sind für die spezifische Erkennung von Pathogenen die Proteine der über 300 MHC-Gene verantwortlich (Rhodes und Trowsdale, 1999). In Pflanzen wird angenommen, dass Produkte von *R*-Genen die Funktion der Pathogenerkennung übernehmen (Kap. 4.3.2.) und ebenfalls mit einer Vielzahl von Sequenzhomologen vorliegen<sup>3</sup> (Reviews: Bent, 1996; Hammond-Kosack und Jones, 1997; Roland, 1998; Ellis *et al.*, 2000; Young, 2000; Gebhardt und Valkonen, 2001); dies wird durch Ergebnisse dieser Arbeit gestützt.

Zur Detektion von Pathogenresistenz-vermittelnden Regionen wurden Sonden genutzt, welche signifikante Homologien zu bekannten *R*-Genen des NBS-LRR-Typs (Kap. 1-3), wie z.B. *Pfr* in Tomate, *Rx* in Kartoffel, *N* in Tabak, *RPS2* in *Arabidopsis* und *L6* in Flachs, aufwiesen (Tab. 2-1-b). Somit kann angenommen werden, dass ausschließlich Klone mit NBS-LRR-Resistenzgenhomologen identifiziert wurden. Die hohe Anzahl an positiven Klonen lässt auf eine hohe Zahl von NBS-LRR-RGLs im Kartoffelgenom schließen (Tab. 3-1). Diese Beobachtung deckt sich mit Informationen von anderen Pflanzengenomen. So weist beispielsweise das vollständig sequenzierte *Arabidopsis*-Genom insgesamt 149 NBS-LRR-Resistenzgene auf (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000) und im Reisgenom werden bis zu 1500 Gene diesen Typs vermutet (Young, 2000). Unter der Annahme, dass Produkte der *R*-Gene an spezifischen Wechselwirkungen mit *Avr*-Produkten zur

<sup>3</sup> Der angeführte Vergleich zwischen MHC- und *R*-Genen impliziert keine strukturellen oder spezifischen funktionellen Analogien oder Homologien.

Pathogenerkennung beteiligt sind (Kap. 1.3; Kap. 4.3.2.), ist unter ko-evolutionären Aspekten das Vorhandensein von vielen Sequenzhomologen als vorteilhaft für die Pflanzenresistenz einzustufen, da hierdurch eine hohe Variabilität gewährleistet zu sein scheint.

Im Gegensatz zu den MHC-Genen, welche sich in einer einzigen genomischen Region befinden (Rhodes und Trowsdale, 1999), sind *R*-Gene in allen bisher untersuchten Pflanzengenomen auf mehrere Loci verteilt (Young, 2000). Eine solche genomweite Verteilung von Resistenzgenen wurde auch im Rahmen dieser Arbeit festgestellt; lediglich auf zwei Kopplungsgruppen konnten keine RGLs detektiert werden (Abb. 3-3).

Die RFLP-Analysen zeigten, dass die meisten BAC-Klone mehrere RGLs beinhalteten (Abb. 3-1). Dies spricht für ein Auftreten von RGLs in Clustern. Auch in anderen Pflanzengenomen konnte die Organisation von mehreren Resistenzhomologen in Clustern beobachtet werden. In der Tomate identifizierten beispielweise Parniske *et al.* (1997) tandemartige Genduplikate an dem *Cf-4/9*-Locus und Simons *et al.* (1998) an dem *I2*-Locus ein Cluster mit 6 Homologen. Es wird diskutiert, dass solche Cluster ausgehend von einem Ursprungsgen durch Genduplikationen gefolgt von Diversifikationen evolvieren (Pryor und Ellis, 1993; Michelmore und Meyers, 1998; Gebhardt und Valkonen, 2001).

Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass es Loci gibt, an die mehrere Klone kartiert werden konnten, welche mit unterschiedlichen Sonden identifiziert worden waren. Bei diesen Klonen gab es allerdings keine Kreuzhybridisierungen, d.h., dass die einzelnen Klone mit nur jeweils einer der Sonden hybridisierten (siehe Abb. 3-3 KG V, VI). Dies deutet darauf hin, dass innerhalb dieser Loci/Cluster Resistenzgene des gleichen Typs, aber dennoch unterschiedlicher Sequenzen vorliegen. Für diese RGL-Cluster kann spekuliert werden, dass nicht ausschließlich Genduplikationen an deren Evolution beteiligt waren, sondern Sequenzaustausche zwischen physikalisch getrennten Clustern. Solche Rekombinationsereignisse zwischen verschiedenen Loci werden von Parniske und Jones (1999) für drei *Hcr9*-Cluster in der Tomate diskutiert.

**Variabilität des Kartoffelgenpools.** SNPs stellen mit 92%, im Vergleich zu 8% Indels, (Tab. 3-3) die meisten der identifizierten DNA-Polymorphismen. Dies entspricht dem im menschlichen Genom beschriebenen Anteil von 90% SNPs (Collins *et al.*, 1998). Als primäre Faktoren von allelischen Variationen dienen (1) die Mutationshäufigkeit und (2) die Wahrscheinlichkeit der Fixierung dieser Mutationen (Li, 1997). Beide Faktoren können zur Erklärung des Unterschieds zwischen den beiden Polymorphismustypen beitragen. So kann spekuliert werden, dass Punktmutationen häufiger auftreten als zu Insertionen bzw. Deletionen führende Mutationsereignisse. Bei den Punktmutationen kann weiterhin zwischen den verschiedenen Substitutionstypen differenziert werden, wobei der größere Anteil an Transitionen auffällt ( $Ti/Tv = 1,51$ ; Tab 3-5). Dieser Häufigkeitsunterschied stimmt

mit in anderen Untersuchungen beschriebenen Werten überein (Schneider *et al.*, 2001) und lässt sich mit den zugrundeliegenden chemischen Eigenschaften erklären. So sind Wechsel zwischen den Purinen bzw. zwischen Pyrimidinen häufiger als Austausch zwischen Purinen und Pyrimidinen (Hillis, 1990). Ein weiterer Grund für das Verhältnis zwischen SNPs und Indels ist die Wahrscheinlichkeit der Fixierung von Mutationen. Insertionen und Deletionen können während der Rekombinationsereignisse problematisch sein, so dass bereits eine stabilisierende Selektion gegen die Fixierung dieses Polymorphismentyps auf DNA-Ebene denkbar ist<sup>4</sup>.

In diesem Zusammenhang ist ein Vergleich zwischen Regionen mit Homologien zu bekannten Genen und Regionen ohne Homologien aufschlussreich (Tab. 3-3). Bei der ersten Gruppe ist anzunehmen, dass es sich - zumindest teilweise - um kodierende Sequenzen handelt und somit an deren Produkten Selektion ansetzen kann. Sowohl die Frequenz der SNPs als auch die der Indels ist in diesen Regionen niedriger als in den Regionen ohne Homologien. Diese Beobachtung ist mit dem Einfluss stabilisierender Selektion zu erklären. Hierbei fällt allerdings auf, dass die Variabilitätsunterschiede zwischen den (möglicherweise) kodierenden und nicht-kodierenden Regionen bei den Indels deutlich stärker ausgeprägt sind (55,6% Unterschied) als bei den SNPs (17,2% Unterschied). Dies ist auf die in der Regel weitreichendere Auswirkung von Deletionen/Insertionen auf die Genprodukte (z.B. durch Leserasterverschiebungen) im Vergleich zu den Konsequenzen von Punktmutationen zurückzuführen. Interessant ist eine gesonderte Analyse der Regionen, welche homolog zu Resistenzgenen sind. Bei den RGLs ist die Häufigkeit von Indels fast identisch mit der durchschnittlichen Häufigkeit aller Regionen mit Homologien. Die SNP-Frequenz in RLGs ist allerdings genauso hoch wie bei den Regionen ohne Homologien. Somit scheint also in RGLs eine stabilisierende Selektion gegen ‚drastische‘ Veränderungen zu wirken, allerdings nicht gegen ‚kleine‘ Variationen der Produkte. Diese Beobachtung fügt sich in die bereits diskutierte Erklärung ein, dass Produkte der RGLs an spezifischen Pathogenerkennungen beteiligt sind (siehe auch Kap. 1.3; Kap. 4.3.2.) und deshalb eine hohe Variabilität vorteilhaft erscheint.

Die bisherigen Betrachtungen bezogen sich auf die in der Untersuchungspopulation beobachteten Häufigkeiten von Polymorphismen (Frequenzen). Da Frequenzangaben unmittelbar von der Anzahl der untersuchten Genotypen abhängen und nicht die jeweils SNP-spezifischen Häufigkeiten einbeziehen, wurde zur Abschätzung der Variabilität des Genpools die Nukleotid-Diversität  $\pi$  (Nei, 1987; Li und Sadler, 1991; Li, 1997) berechnet (Tab. 3-4). Die Nukleotid-Diversität gibt die Anzahl der Nukleotidunterschiede zwischen zwei zufällig ausgewählten homologen Sequenzen in einer Population an. Die durchschnittliche Nukleotid-Diversität liegt bei  $7,4 \times 10^{-4}$  und ist damit vergleichbar mit beim Menschen

---

<sup>4</sup> Es sei darauf hingewiesen, dass im klassischen Sinn die Selektion – als einziger richtender Evolutionsfaktor - auf phänotypischer Ebene ansetzt (Sauer, 1987).

ermittelten  $\pi$ -Werten von  $3 - 8 \times 10^{-4}$  (Nei und Li, 1979; Wang *et al.*, 1998; Cargill *et al.*, 1999; Halushka *et al.*, 1999; Sunyaev, 2000). Sie liegt allerdings niedriger als der einzige bisher für Pflanzen publizierte Wert von  $7,6 \times 10^{-3}$  bei der Zuckerrübe, welcher auf Grundlage von lediglich 2 diploiden Genotypen und 37 Loci erhoben wurde (Schneider *et al.*, 2001).

Bei der Betrachtung der Variabilität muss berücksichtigt werden, dass es sich bei den analysierten Genotypen primär um Zuchtmaterial handelt (Kap. 2.4.2.1.). Somit kommt neben den bereits diskutierten Evolutionsfaktoren der Mutation und Selektion vor allem einem weiteren eine Bedeutung zu: der Migration bzw. dem Genfluss zwischen Populationen (Futuyma, 1986). Dieser die Variabilität erhöhende Faktor erfolgt in den ‚unnatürlichen‘ Populationen der Züchtung durch gezieltes Einkreuzen verschiedener Sorten. Interessant ist ein Vergleich der Variabilität zwischen den di- und tetraploiden Genotypen. Hier zeigte sich, dass die diploiden Genotypen einen höheren  $\pi$ -Wert ( $2,3 \times 10^{-3}$ ) aufweisen als die tetraploiden ( $7,2 \times 10^{-4}$ ). Dies ist teilweise darauf zurückzuführen, dass Wildarten (z.B. *Solanum phureja*) mit größeren genetischen Distanzen in die Untersuchungen eingegangen sind. Da allerdings bei der Berechnung der Nukleotid-Diversität die Häufigkeitsverteilungen der Allele berücksichtigt werden, tragen Autapomorphien nicht stark zur Erhöhung des  $\pi$ -Wertes bei. Als bedeutende Quelle für das Erhalten von genetischer Variation ist die meiotische Rekombination einzustufen (Futuyma, 1986; Sauer, 1987). Somit kann spekuliert werden, dass dieser Variabilitäts-fördernde Faktor ursächlich für den beobachteten Unterschied zwischen di- und tetraploiden Genotypen ist, da diploide Pflanzen (in der Regel) selbstinkompatibel sind, dies allerdings nicht für alle tetraploiden Genotypen zutrifft (Hawkes, 1994).

Die hohe genetische Variabilität spiegelt sich ebenfalls in dem hohen Grad an heterozygot vorliegenden Polymorphismen wider (Tab. 3-6), ein genetischer Parameter, für den Vergleichswerte aus anderen dokumentierten Arbeiten bisher fehlen. Erwartungsgemäß liegen in tetraploiden Genotypen mehr SNPs und Indels heterozygot vor als in den diploiden Genotypen; denn beim Vorhandensein von 4 homologen Chromosomen ist die Wahrscheinlichkeit des gleichzeitigen Auftretens allelischer Varianten größer als bei 2 homologen Chromosomen. Insbesondere unter züchterischen Aspekten kann über die Vorteile eines hohen Heterozygotiegrads spekuliert werden. Zum einen gewährleistet Heterozygotie eine Aufrechterhaltung genetischer Varianz (Futuyma, 1986; Sauer, 1987). Zum anderen können heterozygote Genotypen ‚bessere‘ - in natürlichen Populationen Fitness-steigernde, in Züchtungspopulationen agronomisch wichtige - Merkmalausprägungen aufweisen als die jeweiligen homozygoten Genotypen (Gardner und Snustad, 1981; Comings und MacMurray, 2000). Es wird angenommen, dass dieser Heterosis-Effekt auf additive Effekte zurückzuführen ist (Futuyma, 1986; Sauer, 1987).

## 4.2. Methoden zum quantitativen Genotypisieren von Polymorphismen in polyploiden Organismen

Aufgrund der weitreichenden Anwendungsmöglichkeiten wurde in den letzten Jahren eine Vielzahl von Methoden zum Genotypisieren vorgestellt (Kap. 1.5.1.) und eine Reihe von Studien mit diesen Techniken durchgeführt (Kap. 1.4.). Obwohl viele Organismen polyploide Genome aufweisen – vor allem Pflanzen, darunter agronomisch wichtige Nutzpflanzen, aber auch Tierarten, wie beispielsweise einige Amphibien (Hieter und Griffiths, 1999) –, fehlen bisher dokumentierte Untersuchungen zur Nutzbarkeit von Methoden zum quantitativen Genotypisierung in polyploiden Organismen und somit Studien, bei welchen Genotypisierungsdaten bei solchen Spezies unter Berücksichtigung der exakten Allelverhältnisse erhoben worden wären. Mit der vorliegenden Arbeit wurden erstmals sowohl Methoden auf deren Verwendbarkeit in polyploiden Genomen untersucht (Rickert *et al.*, 2002), als auch diese Erkenntnisse bei einer QTL-Analyse eingesetzt (Kap. 4.3.).

Im Folgenden werden zunächst die Evaluierungs- und Optimierungsergebnisse der getesteten Genotypisierungsmethoden einzeln diskutiert, um dann einen abschließenden Vergleich zu ermöglichen.

**BigDye-Sequencing.** Das konventionelle Sequenzieren wurde sowohl zur primären Identifizierung als auch zur Genotypisierung von SNPs genutzt (Kap. 3.1.1. und 3.2.2.; Kwok, 2000). Dies ist als ein besonderer Vorteil der Methode anzusehen, da es nicht erforderlich ist, anders als bei allen anderen Methoden, einen neuen Assay zu entwickeln und ggf. zu optimieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt sechs SNPs mit *BigDye-Sequencing* genotypisiert. Hierbei erwies sich die Methode als sehr robust und geeignet zum Genotypisieren in tetraploiden Organismen (Tab. 3-10, Tab. 3-11). So konnten alle sechs SNPs in der gesamten Untersuchungspopulation genotypisiert werden. Auch eine erstmals in dieser Arbeit dokumentierte quantitative Genotypisierung eines tri-allelischen SNPs in tetraploiden Genomen, sogar beim gleichzeitigen Vorhandensein aller drei Allele in einem Genotyp, war mit dem *BigDye-Sequencing* möglich (Abb. 3-7; Premstaller *et al.*, 2002). Aufgrund sequenzabhängiger, unterschiedlicher Effizienzen beim Einbau verschiedener Didesoxy-Nukleotide (siehe dazu die Diskussion über *Minisequencing*) ist es zur genauen Bestimmung der Allelverhältnisse erforderlich, auf der Basis eines Standards (z.B. eines bekannten „2-2“-heterozygoten Genotyps) einen für jeden SNP individuellen Korrekturfaktor zu berechnen, mit dem die jeweiligen Verhältnisse angepasst werden. Grundsätzlich ist eine deutlich höhere Genauigkeit zu erzielen, wenn sowohl der *sense*- als auch der *antisense*-Strang sequenziert und das Allelverhältnis auf Basis beider Werte berechnet wird (Tab. 3-11). Die durchschnittliche Abweichung lag bei 2,8% und ist somit um 2,2% genauer als Bestimmungen von Allelfrequenzen in gepoolten DNA-Proben, welche

von Kwok *et al.* (1994) mit *BigDye-Sequencing* durchgeführt worden waren. Es ist allerdings anzumerken, dass bei Frequenzbestimmungen in gepoolten Proben gemessene Ungenauigkeiten auch durch das Erstellen der DNA-Pools hervorgerufen werden können (siehe dazu auch die Diskussion über *Pyrosequencing*).

**PCR-basierte Genotypisierungsmethoden.** Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden lediglich zwei allelspezifische PCRs und ein DFLP-Assay genutzt (Kap. 3.1.2.). Grundsätzlich muss für jeden Polymorphismus die allelspezifische PCR empirisch optimiert werden (Syvänen, 2001). So konnte bei dem SNP BA106h21/94 eine Genotypisierung nicht erfolgreich optimiert werden, und bei den beiden anderen Polymorphismen waren keine exakten Differenzierungen zwischen den verschiedenen heterozygoten Allelkompositionen möglich. Die quantitative Ungenauigkeit ist allerdings nicht auf die Spezifität der enzymatischen Reaktion zurückzuführen, sondern vielmehr auf die Ungenauigkeit bei der Analyse der allelspezifischen PCR-Produkte mit Agarosegelen. Diese Erklärung wird dadurch gestützt, dass bei alternativen Analysen von allelspezifischen PCR-Produkten - bei welchen die Struktur der Produkte auf Basis der Schmelztemperatur analysiert wird - sogar quantitative Aussagen über Allelfrequenzen in DNA-Pools mit Abweichungen um 5% möglich sind (Germer und Higuchi, 1999; Germer *et al.*, 2000).

**Minisequencing.** Bei der hier gewählten Variante des *Minisequencings* wird die Spezifität der Primer-Extension mit der quantitativen Genauigkeit der denaturierenden HPLC (Oefner und Underhill, 1998) kombiniert (Hoogendorn *et al.*, 2000).

Wie beim *BigDye-Sequencing* fällt auch beim *Minisequencing* auf, dass die allelischen Peakhöhen der Chromatogramme nicht direkt die Allelfrequenzen der heterozygoten Proben widerspiegeln (Tab. 3-6). Dies kann entweder durch eine unterschiedliche Effizienz bei der Inkorporation der allelischen Didesoxy-Nukleotide (Haff und Smirnov, 1997) oder durch Unterschiede bei der PCR-Amplifikation der Allele (Livak *et al.*, 1995) erklärt werden. Im Rahmen dieser Arbeit vorgenommene Untersuchungen schließen die zweite Erklärung aus, da für mehrere SNPs Genotypisierungen sowohl auf Basis von heterozygoten PCR-Produkten als auch mit synthetischen Oligonukleotiden, welche die heterozygoten allelischen Verhältnisse simulierten, durchgeführt wurden. Da jeweils in beiden Messungen identische Korrekturfaktoren berechnet wurden, scheinen die Unterschiede auf verschiedene Effizienzen der Inkorporation der allelischen Nukleotide zu beruhen. Beim Vergleich mit den anderen Genotypisierungsmethoden fällt auf, dass diese systematischen allelischen Unterschiede nur bei den Methoden auftreten, bei welchen Didesoxy-Nukleotide an der polymorphen Position zur Diskriminierung eingebaut werden (*BigDye-Sequencing*, *Minisequencing*), allerdings nicht bei Methoden, bei welchen mit normalen Nukleotiden über die allelische Position hinaus polymerisiert wird (Primer-Elongation auf DNA-Chips,

*Pyrosequencing*). Weiterhin scheint der Grad der unterschiedlichen Effizienzen bei der Inkorporation von allelischen Didesoxy-Nukleotiden von der verwendeten Polymerase abzuhängen, da bei der Genotypisierung identischer SNPs beim *BigDye-Sequencing* (AmpliTaQ Polymerase FS) und beim *Minisequencing* (Thermo Sequenase) verschiedene Korrekturfaktoren ermittelt wurden. Schließlich beeinflusst die den SNP umgebende Sequenz die Inkorporationseffektivität, da identische Basenaustausche in verschiedene SNPs unterschiedliche Abweichungen aufwiesen (siehe auch Hoogendoorn *et al.*, 2000; Giordano *et al.*, 2001).

Zum Optimieren der jeweiligen Tests war neben der Bestimmung der SNP-spezifischen Korrekturfaktoren auch die empirische Ermittlung der optimalen Temperatur während der DHPLC erforderlich, welche insbesondere zur Separation bei A-T-SNPs hoch gewählt werden musste (Abb. 3-10). Insgesamt erwies sich die SNUPE in Kombination mit DHPLC als eine äußerst robuste Genotypisierungsmethode, sowohl für bi- als auch tri-allelische SNPs (Abb. 3-11; Tab. 3-10; Tab. 3-11). Für alle 16 Polymorphismen, welche mit diesem Ansatz analysiert werden sollten, konnten erfolgreich Genotypisierungen durchgeführt werden. Dies traf auch auf jene SNPs zu, welche mit *Pyrosequencing* (s.u.) nicht genotypisiert werden konnten. Auch die quantitative Genauigkeit mit einer ermittelten durchschnittlichen Abweichung von 4,9% kann als zum Genotypisieren in tetraploiden Organismen ausreichend eingestuft werden (Abb. 3-9; Tab. 3-11). Allerdings ist diese Ungenauigkeit größer als die von Hoogendoorn *et al.* (2000) und Giordano *et al.* (2001) beschriebenen durchschnittlichen Abweichungen von 1,3% bzw. 1,4%, welche bei Frequenzbestimmungen von neun bzw. zwei SNPs in gepoolten DNA-Proben ermittelt worden waren.

Im Vergleich zu anderen Genotypisierungsmethoden erweist sich die lange Analysezeit, bedingt durch die DHPLC (14h pro 96 Proben), als nachteilig. Um diesen Faktor zu optimieren, wurde versucht, den betreffenden Arbeitsschritt für mehrere Proben zu parallelisieren. Dies erfolgte zum einen durch die Verwendung eines HPLC-Instrumentes mit 16 Säulen. Zum anderen wurde die Möglichkeit untersucht, mehrere Proben gleichzeitig in einer Säule zu analysieren. Um die Primer-Extension-Produkte von verschiedenen Genotypisierungsreaktionen in einer Säule unterscheiden zu können, wurden die einzelnen Reaktionen mit Primern durchgeführt, welche mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt waren. Zu diesem Verwendungszweck wurden verschiedene Fluorophore auf ihren Einfluss auf die Separationseigenschaften getestet. Bei der Verwendung der hydrophoben Fluorophore ROX und NED war keine Trennung der verschiedenen allelischen Extensionsprodukte möglich. Waren die Extensions-Primer mit HEX, TAMRA oder FAM markiert, konnten sowohl die unverbrauchten Primer von den Produkten, als auch diese voneinander separiert werden (Abb. 3-12). Insgesamt wurde festgestellt, dass die Qualität der Auftrennung mit abfallender Hydrophobizität zunimmt (ROX < NED < TAMRA < HEX <

FAM). So erfolgt die Separation mit dem polarsten Fluorophor unter den getesteten (FAM) mit einer ähnlichen Effizienz wie bei unmarkierten Extensionprodukten. Da sich letztlich drei Farbstoffe als geeignet erwiesen, konnten pro Säule drei Reaktionen gleichzeitig aufgetrennt werden (Abb. 3-13). Dies ergibt bei einer Verwendung des 16-Array-HPLC-Instruments eine Parallelisierung von insgesamt 48 Analysen.

**Allelspezifische Hybridisierung auf DNA-Chips.** SNP-Genotypisierungen über Hybridisierungen auf DNA Chips erfordern mehrere Optimierungsschritte (Syvänen, 2001). Bezüglich SNP-unabhängiger Bedingungen erwiesen sich Epoxy- und Aldehyd-aktivierte Chip-Oberflächen als gleich gut geeignet. Beim Vergleich von 5'-SH- und 5'-NH<sub>2</sub>-modifizierten Fänger-Oligonukleotiden zeigten 5'-SH-modifizierte Sonden deutlich stärkere und spezifischere Signal (Abb. 3-14). Entscheidend für eine optimale allelische Diskriminierung ist die Einstellung der Hybridisierungsbedingungen. Obwohl die Thermostabilität eines Hybrids zwischen einer ASO-Sonde und der Zielsequenz theoretisch berechnet werden kann (Mir und Southern, 1999), ist eine exakte Vorhersage der Hybridisierungsparameter schwierig (Syvänen, 2001). Folglich mussten die für jeden SNP spezifischen Bedingungen empirisch ermittelt werden (Abb. 3-17). Hierbei hat es sich allgemein als hilfreich erwiesen, für jeden SNP mehrere Fänger-Oligonukleotide, welche bezüglich der relativen Lage der polymorphen Position und der Orientierung variiert werden, aufzuspotten und zu testen (z.B. Gut 2001). Es zeigten sich teilweise deutliche Spezifitäts- und Signalunterschiede zwischen den einzelnen Varianten für einen SNP (Kap. 3.1.4.). Interessanterweise konnte dies auch festgestellt werden, wenn zwei Sonden mit dem identischen Bereich der den SNP flankierenden Sequenz hybridisierten und sich lediglich in der Orientierung (*sense* und *antisense*) unterschieden (Abb. 3-16). Die Verwendung mehrerer DNA-Sonden mit unterschiedlichen Hybridisierungsparametern für jeden SNP ermöglichte es, Bedingungen zu ermitteln, bei welchen für jeden SNP mit zumindest einigen Fänger-Oligonukleotiden analysierbare Hybridisierungen erfolgten. Dennoch stellt die Notwendigkeit zur Optimierung der Reaktionsbedingungen bei DNA-Chips ein grundsätzliches Problem dar, vor allem, wenn die einheitlichen Parameter nicht nur für drei, sondern eine Vielzahl von SNPs eingestellt werden müssen (z.B. Wang *et al.*, 1998; Mei *et al.*, 2000).

Bei den Genotypisierungen mit tetraploiden Genomen zeigte sich eine eingeschränkte, aber prinzipiell vorhandene Eignung der ASO-Hybridisierung auf *Micorarrays* zum quantitativen Genotypisieren (Tab. 3-10). Mit einem der untersuchten SNPs war keine zuverlässige Genotypisierung möglich, und bei einem weiteren SNP reichte die quantitative Genauigkeit nicht zur Differenzierung zwischen den drei heterozygoten Allelverteilungen. Mit dem dritten SNP wiederum konnte eine quantitative Genauigkeit demonstriert werden, mit welcher eine Diskriminierung aller fünf möglichen allelischen Verteilungen durchgeführt werden konnte

(Abb. 3-18-b). Diese Erfolgsrate entspricht Ergebnissen von Cho *et al.* (1999), bei deren Analyse von vorselektierten SNPs in dem diploiden und somit einfacheren Genom von *A. thaliana* in 64% der Fälle zwischen den beiden homozygoten Zuständen unterschieden werden konnte und bei 57% der SNPs eine Differenzierung zwischen den drei Allelzuständen möglich war.

**Primer-Elongation auf DNA-Chips.** Von den insgesamt drei untersuchten SNPs waren Genotypisierungen nur bei einem SNP möglich und bei diesem spiegelten die Signalverhältnisse nicht die heterozygoten Verhältnisse wider (Abb. 3-20), so dass eine quantitative Genotypisierung bei keinem Polymorphismus möglich war (Tab. 3-10). Es muss allerdings berücksichtigt werden, dass die Bewertung auf Experimenten mit lediglich drei SNPs beruht. Da diese Genotypisierungsmethode einen relativ neuen Ansatz (Erdogan *et al.*, 2001; Huber *et al.*, 2001) darstellt, fehlen zum Vergleich dokumentierte umfangreiche Genotypisierungsstudien.

Erdogan *et al.* (2001) schlugen vor, dass die Intensität von falsch-positiven Signalen durch kürzere *Annealing*- und Extensionszeiten reduziert werden könnte. Untersuchungen dieser Arbeit zeigten jedoch, dass durch die Verkürzung dieser *Cycle*-Parameter keine höhere Spezifität erreicht wurde und die Signalintensität insgesamt abnahm (Abb. 3-19). Die geringen Signalstärken bei sehr kurzen Zeiten (-50%) lassen sich am einfachsten dadurch erklären, dass die für ein effektives *Annealen* und optimale Kettenverlängerung notwendigen Minimalzeiten unterschritten wurden. Merkwürdig ist allerdings, dass unspezifische Signale, die bei um 25% verkürzten Zeiten entstehen, bei nicht-verkürzten Zeiten geringer sind. Grundsätzlich konnten bei allen untersuchten SNPs relativ starke falsch-positive Signale beobachtet werden. Hierbei hing die Intensität der unspezifischen Signale von der jeweiligen Allelkombination des terminalen *Mismatches* ab. Diese basenabhängigen Diskriminierungspotentiale der *Taq*-Polymerase entsprechen Ergebnissen einer vergleichenden Studie zur Spezifität bei allelspezifischen PCR-Amplifikationen (Huang *et al.*, 1992). So war beispielsweise das falsch-positive Signal bei C (Primer) und A (Template) stärker als jenes von G und A und dieses wiederum stärker als bei A und A (Abb. 3-19).

**Pyrosequencing.** Mit *Pyrosequencing* wurden für die Kartierungen und die QTL-Analyse die meisten Polymorphismen genotypisiert. Insgesamt wurden 88 Polymorphismen analysiert, von denen 33 zunächst nicht erfolgreich ausgewertet werden konnten (Kap. 3.1.6.). Diese relativ hohe Fehlerrate lässt sich primär auf sequenzspezifische Probleme zurückführen. Da die *Pyrosequencing*-Reaktion wegen der Temperatursensivität des Enzyms Luciferase bei einer niedrigen Temperatur von 28°C aufgeführt werden muss, kann es, abhängig von der jeweils gegebenen Sequenz, leicht zur Formation von Dimeren oder *Hairpins* bei dem Sequenzierprimer oder dem *Template* kommen, was zu falschen

Signalen führt (Alderborn *et al.*, 2000). Ein weiteres Problem tritt auf, wenn eines der allelischen Nukleotide Teil eines Homopolymers bestehend aus drei oder mehr Basen ist. Aufgrund des Prinzips von *Pyrosequencing* addieren sich die Signale von den konservierten Basen des Homopolymers und das der polymorphen Base, und eine ausreichend quantitative Auflösung ist nicht mehr möglich (Abb. 3-23). Dieses Ergebnis deckt sich mit der Beobachtung von Ronaghi (2001), dass *Pyrosequencing* nicht zum Sequenzieren geeignet ist, wenn das zu sequenzierende Fragment einen Abschnitt von mehr als fünf identischen Nukleotiden enthält. Die beschriebenen sequenzabhängigen Probleme bei *Pyrosequencing* werden teilweise durch die gegebene Flexibilität beim Entwerfen des Sequenzierprimers aufgehoben, da beide Stränge als *Template* dienen können, der Sequenzierprimer bis zu fünf Basen von dem SNP platziert und die *Annealing*temperatur des Sequenzierprimers stark variiert werden kann (zwischen 40°C und 60°C). Nach erneutem Entwerfen von Sequenzierprimern konnten weitere 12 SNPs erfolgreich genotypisiert werden. Für einen SNP konnte durch die Zugabe von SSB (*single strand binding protein*) die Analysequalität verbessert werden (Abb. 3-24). Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung könnte sein, dass SSB das Enzym Apyrase von der DNA verdrängt (Ronaghi, 2000) und somit der Abbau unverbrauchter Nukleotide effizienter wird. Diese Hypothese wird auch durch einen deutlich steileren Abfall der *Peaks* der Pyrogramme bei *Pyrosequencing*-Reaktionen mit SSB gestützt. Nach intensiven Optimierungsversuchen konnte letztlich eine Erfolgsquote von 77% für *Pyrosequencing* erreicht werden (Tab. 3-10). Hierbei zeigte sich, dass bei manuellen Festlegungen der Dispensionsreihenfolge (Tab. 9-9) auch Genotypisierungen von Indels, tri-allelischen SNPs (Abb. 3-22) und mehreren aufeinanderfolgenden SNPs möglich sind.

Die Auswertung der Genotypisierungsergebnisse ergab eine gute quantitative Genauigkeit mit einer durchschnittlichen Abweichung von 2,8 % bei einer Streuung von 0 % bis 13 % (Tab. 3-11). Somit konnten bis auf in einer Messung Zuordnungen zu einer der möglichen Allelkompositionen gemacht werden. Bei weiteren Untersuchungen zur Messgenauigkeit mit artifiziell erstellten, allelischen Mischproben zeigte sich die Tendenz, dass die Bestimmung der Allelfrequenzen umso unpräziser wird, je weiter sich die Allelverteilungen vom 1 zu 1 Verhältnis entfernen (Abb. 3-25).

Da bei Kopplungs- und Assoziationsstudien viele Genotypisierungsdaten erhoben werden müssen und dies sowohl zeit- als auch kostenintensiv ist, schlugen Barcellos *et al.* (1997) vor, die Genotypisierungen nicht in jedem Individuum einzeln vorzunehmen, sondern die Allelfrequenzen in den zu vergleichenden Gruppen (*cases* und *controls*) zu ermitteln, indem für beide Gruppen DNA-Pools erstellt werden und dann lediglich diese genotypisiert werden. Dieser Ansatz setzt allerdings eine Methode zur exakten Bestimmungen der Allelfrequenzen voraus. Da *Pyrosequencing* diesem Anspruch relativ nah kam, wurden zwei SNPs in jeweils fünf verschiedenen DNA-Pools unterschiedlicher Größe und Zusammensetzung genotypisiert

und die ermittelten Allelfrequenzen mit den erwarteten Frequenzen verglichen (Tab. 3-7). Zunächst konnte festgestellt werden, dass der Grad der Messungengenauigkeit nicht mit der Größe der DNA-Pools korreliert. Die ermittelten Abweichungen bei dem SNP BA44a10T3/114 lagen zwischen 4,6% und 8,1% und für den SNP BA44a10T3/174 zwischen 0,1% und 3,2%. Die wahrscheinlichste Erklärung für die größere Ungenauigkeit bei dem SNP BA44a10T3/114 ist darin zu sehen, dass bei diesem C-T-SNP ein weiteres konserviertes C folgt (s.o.). Somit spiegeln die Ergebnisse der Frequenzbestimmungen bei SNP BA44a10T3/174 die quantitative Genauigkeit bei optimalen Bedingungen wider. Unter solchen Voraussetzungen scheint die Durchführung von Studien auf Basis von Allelfrequenzbestimmungen in gepoolten DNA-Proben mit *Pyrosequencing* möglich zu sein, zumindest für ein primäres Vorselektieren von geeigneten Markern.

**Vergleichende Beurteilung der getesteten Genotypisierungsmethoden.** Zunächst ist festzustellen, dass sich die Methoden der allelspezifischen PCR und der Primer-Elongation auf DNA-Chips als nicht geeignet zum quantitativen Genotypisieren in polyploiden Organismen herausstellten (Tab. 3-11). Beiden Ansätzen ist gemein, dass die allelspezifische Wechselwirkung das Prinzip der Primer-Extension nutzt, wobei die Spezifität darüber erfolgt, ob der Primer in Abhängigkeit von dem vorliegenden Allel korrekt bindet und es dementsprechend zur Elongation kommt oder diese unterbleibt (siehe auch Kap. 1.5.1.). Ob diese Gemeinsamkeit allerdings für die Resultate verantwortlich ist, kann auf Grundlage der erhobenen Ergebnisse nicht entschieden werden. Die verbleibenden vier Methoden erwiesen sich als prinzipiell einsetzbar für Genotypisierungen bei polyploiden Genomen. Beim Vergleich fällt auf, dass die auf Hybridisierung gestützte Methode (allelspezifische Hybridisierung auf DNA-Chips) eine deutlich geringere Spezifität bei der allelischen Diskriminierung aufweist als die drei Enzym-basierten Methoden (*BigDye-Sequencing*, *Minisequencing* und *Pyrosequencing*). Kwok (2000) stellte die theoretische Überlegung an, dass prinzipiell *real time assays* eine höhere quantitative Genauigkeit haben sollten als *end point assays*. Diese Differenzierung wird durch die Ergebnisse dieser Arbeit allerdings nicht gestützt, da die quantitative Messgenauigkeit beim *Pyrosequencing* - ein Beispiel für einen *real time assay* - etwa denen entsprechen, die mit *BigDye-Sequencing* oder *Minisequencing* - beides *end point assays* - erzielt wurden.

*BigDye-Sequencing* und *Minisequencing* erwiesen sich als ausgesprochen robuste Methoden, mit denen alle getesteten Polymorphismen untersucht werden konnten. Hingegen gab es SNPs, welche mit *Pyrosequencing* und ASO-Hybridisierungen auf DNA-Chips nicht genotypisiert werden konnten. In diesem Zusammenhang ist auch zu sehen, dass es sich bei diesen beiden Ansätze insbesondere bei der ASO-Hybridisierung um optimierungsaufwendige Methoden handelt. Diese jeweils SNP-spezifischen Vorarbeiten sind zeitintensiv und amortisieren sich erst bei einer höheren Anzahl von Individuen, in

denen der spezifische SNP genotypisiert werden soll. Andererseits ist gerade mit *Pyrosequencing* ein hoher und schneller Probendurchsatz möglich. Der besondere Vorteil der Chip-basierten Methode liegt in der Möglichkeit zur parallelen Genotypisierung vieler SNPs bei einem einzelnen Individuum. Gerade bei großen Probendurchsätzen kann der Kostenaspekt eine entscheidende Rolle spielen. Hierbei erweist sich *Minisequencing* (ohne fluoreszenzmarkierte Extensionsprimer) als die mit Abstand günstigste Alternative, wobei beim konventionellen *BigDye-Sequencing* die höchsten Kosten anfallen (detaillierte Auflistung Tab. 3-12).

Abschließend ist festzustellen, dass die Wahl der Methode von den Rahmenbedingungen der Studie, wie der Anzahl der zu testenden SNPs und der zu untersuchenden Individuen, von den zur Verfügung stehenden Instrumenten, dem Know-how und nicht zuletzt von personellen und finanziellen Mitteln abhängig gemacht werden sollte.

### 4.3. QTL-Analyse zur quantitativen Resistenz gegen *P. infestans*

Die durchgeführte QTL-Analyse diente dem Ziel, Erkenntnisse darüber zu gewinnen, wie viele und welche Loci und mit welchen jeweiligen Stärken einen Einfluss auf die quantitative Resistenz gegen *P. infestans* haben. Darüber hinaus sollte sie aber auch eine Beurteilung der gewählten Strategien zur Analyse von komplexen Merkmalen zulassen.

Die phänotypischen und genotypischen Daten konnten, bevor sie zur Detektion von QTLs kombiniert wurden, gesondert untersucht werden.

**Phänotypische Daten.** Diese Datenreihen zur Resistenz und Reife zeigten, wie erwartet, quantitative Ausprägungen der Zielmerkmale (z.B. Abb. 3-26-a, 3-28-a). Auf Basis der phänotypischen Evaluierungsdaten des Jahres 2001 bezüglich der Resistenz wurden aus beiden F1-Populationen Individuen mit extremen Resistenzwerten, die *cases* und *controls*, ausgewählt. Erwartungsgemäß wiesen die Resistenzdaten dieser Subpopulation zweigipfelige Verteilungen auf (z.B. Abb. 3-28-b, 3-29-b).

Beim Vergleich der Resistenzdaten fiel auf, dass zwischen den Boniturdaten der beiden Jahre erhebliche Unterschiede auftraten. Häufig stellen die phänotypischen Tests einen kritischen Punkt bei QTL-Analysen dar (Young, 1996). Dies ist vor allem darauf zurückzuführen, dass die untersuchten Zielmerkmale eine quantitative Merkmalsausprägung aufweisen, welche nicht nur von den komplexen genetischen, sondern auch von den Umweltbedingungen beeinflusst wird (Johannsen, 1909; Mackay, 2001). So ist bekannt, dass die Feldresistenz durch Faktoren wie Temperatur, Lichtverhältnisse (Intensität und Tageslänge), Nährstoffe und Feuchtigkeit

beeinflusst wird (Wastie, 1991; Harrison *et al.*, 1994). Somit ist die wahrscheinlichste Erklärung für die abweichenden Bonituren darin zu sehen, dass sich die Wetterbedingungen in den Jahren 2000 und 2001 erheblich unterschieden. Die hierdurch bedingte Variation der phänotypischen Werte spiegelte sich auch in der QTL-Analyse wider, so dass nur die dominierensten Effekte eine Kontinuität in beiden Jahren aufwiesen (Kap. 4.3.1.; Tab. 3-15). Ein Vergleich der Resistenzdaten zwischen den beiden Kreuzungspopulationen offenbarte deutlichere Unterschiede zwischen den anfälligsten und resistentesten Genotypen in der Nikita x Leyla Population als in der Escort x Leyla Population (Kap. 3.3.2.). Dies könnte, zusammen mit der kleineren Populationsgröße und der geringere Anzahl an getesteten Markern (insgesamt 15 Marker), dafür verantwortlich sein, dass in der Escort x Leyla Population weniger signifikante QTLs identifiziert werden konnten (Tab. 3-15). Deshalb bezieht sich die Diskussion der identifizierten QTLs (Kap. 4.3.1.), falls nicht anderes vermerkt, auf Ergebnisse in der Nikita x Leyla Population und die mit den *cases* und *controls* durchgeführten Untersuchungen.

**Genotypische Daten.** Auf Basis der SNP-Datenbank konnten spezifisch für die Kreuzungspopulationen segregierende Marker ausgewählt werden. Mit insgesamt 71 Polymorphismen in Kandidatenregionen auf allen 12 Chromosomen wurden erfolgreich Genotypisierungsdaten erhoben (80% der ausgewählten und getesteten Polymorphismen, siehe auch Kap. 4.2.). Bei 5 SNPs entsprachen die ermittelten Allelverhältnisse nicht den erwarteten 25%-Schritten eines SNPs in einem tetraploiden Genom (Kap. 3.3.3.). Die gemessenen 12,5%-, 8%- bzw. 6%-Abstufungen können allerdings dadurch erklärt werden, dass die SNPs in Abschnitten mit 2, 3 bzw. 4 Paralogen vorkommen. Da sich diese SNPs in RGL-Regionen befinden, deckt sich dieser Befund auch mit der bereits bekannten Erkenntnis, dass Resistenzgene häufig in Clustern mit mehreren Genkopien auftreten (siehe Kap. 4.1.; Pryor und Ellis, 1993; Parniske *et al.* 1997; Simons *et al.* 1998; Gebhardt und Valkonen, 2001; Ballvora *et al.*, 2002).

### 4.3.1. Identifizierte QTLs

**QTLs mit Einfluss auf die Resistenz.** Durch die QTL-Analysen mit den Resistenzdaten (AUDPC-Werte) konnten insgesamt 12 Chromosomsegmente auf 10 Chromosomen mit signifikantem Einfluss auf die quantitative Resistenz gegen *P. infestans* identifiziert werden (Tab. 3-15, Abb. 3-31). Dieses Ergebnis belegt den ausgeprägt polygenen Charakter der Feldresistenz, welcher auch durch bisher durchgeführte Kopplungsanalysen zu diesem quantitativen Merkmal dokumentiert ist (Leonard-Schippers *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1998; Meyer *et al.*, 1998; Collins *et al.*, 1999; Oberhagemann *et al.*, 1999; Ewing *et al.*, 2000; Sandbrink *et al.*, 2000; Ghislain *et al.*, 2001; Trognitz *et al.*, 2002). Beim Vergleich der im Rahmen dieser Untersuchung identifizierten QTLs (Abb. 3-31) mit den in anderen Populationen festgestellten

QTLs (Abb. 1-3) ergeben sich einige Übereinstimmungen, allerdings zeigten sich auch neue Loci mit Einfluss auf das Zielmerkmal. Grundsätzlich ist ein Vergleich von Analysen quantitativer Merkmale aufgrund von zwei Gründen schwierig: (1) In der Regel wird mit unterschiedlichen Markern in verschiedenen Regionen des Genoms gearbeitet; und (2) folgt die kontinuierliche Merkmalsausprägung komplexen Mustern, wobei jedes der zugrunde liegenden Allele einen unterschiedlichen Einfluss auf den Phänotyp hat und eine ähnliche Merkmalsausprägung durch eine andere Kombination von verantwortlichen Allelen verursacht werden kann (Steinmetz *et al.*, 2000). In diesem Charakteristikum quantitativer Merkmale könnte ebenfalls – neben der bereits erläuterten kleineren Populationsgröße und geringeren phänotypischen Streuung – begründet liegen, dass in der Escort x Leyla Population nicht dieselben QTLs wie in der Nikita x Leyla Population identifiziert werden konnten (Tab. 3-15; Tab. 3-16). Aufgrund ihrer Reproduzierbarkeit in mehreren QTL-Analysen können dennoch die QTLs auf den Chromosomen III, V und VI als besonders wichtig eingestuft werden. Auch in dieser Untersuchung kartierten QTLs, zumindest in der Nikita x Leyla Population, in ähnliche Positionen. Hierbei zeigte insbesondere der Locus auf Chromosom V deutliche Effekte. Diese Stärke wurde in beiden Populationen hochsignifikant sowohl bei den Korrelationsanalysen als auch bei den Regressionsanalysen mit Kontinuität über die Testjahre und hohen  $R^2$ -Werten belegt (Tab. 3-15, Tab. 3-16). So konnten etwa bei der Nikita x Leyla Population bzw. in beiden F1-Populationen gemeinsam 55% bzw. 56% der phänotypischen Varianz des Zielmerkmals im Jahr 2001 durch die Kombination von 4 Markern dieses starken QTLs erklärt werden. Mit den Analysen wurden des Weiteren neue QTLs beschrieben werden. Die signifikanten Chromosomensegmente auf den Kopplungsgruppen I, VII, VIII und X sind in keiner bisher dokumentierten Arbeit festgestellt worden. Mit Ausnahme des QTLs auf KG VIII handelt es sich bei diesen Loci allerdings um schwach signifikante Effekte (Tab. 3-15).

**Zusammenhang zwischen den quantitativen Merkmalen Resistenz und Reife.** Obwohl bei der hier durchgeführten QTL-Analyse die Identifizierung von QTLs mit Einfluss auf die quantitative Resistenz gegen *P. infestans* im Vordergrund stand, sollte mit der Reife ein weiteres Merkmal berücksichtigt werden. Hintergrund dieser Überlegung war eine von Züchtern schon seit langem beobachtet phänotypische Assoziation zwischen quantitativer Resistenz und Spätreife (Toxopeus, 1958). Die dieser Korrelation zugrunde liegenden Zusammenhänge sind bisher allerdings nicht verstanden (Ewing *et al.*, 2000); prinzipiell sind mehrere Erklärungsmodelle denkbar:

(1) Da trotz intensiver ‚Trennungsbemühungen‘ der Züchter die Selektion von resistenten Pflanzen auch immer in spät reifenden Pflanzen resultiert, ist es unwahrscheinlich, dass bei der Züchtung von quantitativ resistenten Sorten ‚zufällig‘ auf spät reifende Pflanzen selektiert

wurde. Somit scheinen genetisch bedingte Zusammenhänge zwischen den beiden Merkmalen plausibler. So könnte es sein,

(2) dass die beiden Merkmale durch dieselben Gene mit pleiotropen Effekten bewirkt werden, oder

(3) dass die entsprechenden Gene physikalisch eng gekoppelt sind.

(4) Schließlich könnten epistatische Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Genen für die beiden Merkmale für die Korrelation verantwortlich sein.

Um herauszufinden, inwieweit QTLs für Resistenz mit QTLs für Reife übereinstimmen, wurden Loci für dieses Merkmal ebenfalls kartiert. Insgesamt konnten 6 Loci mit signifikantem Einfluss auf die Reife identifiziert werden (Tab. 3-15, Abb. 3-31). Ein Vergleich dieser Loci mit den QTLs für Resistenz zeigte, dass 5 Loci auf den Chromosomen I, III, V, VI und X sowohl mit der Resistenz als auch mit der Reife korrelierten. Lediglich der Locus auf Chromosom IX erwies sich als ausschließlicher QTL für die Reife. Auch Oberhagemann *et al.* (1999) und Ewing *et al.* (2000) analysierten parallel zur Resistenz quantitative Reifeeffekte und kartierten 2 Loci bzw. 4 Loci, welche mit beiden Zielmerkmalen gekoppelt waren, allerdings keinen Locus mit alleinigem Einfluss auf die Reife. Die in diesen Arbeiten beschriebenen QTLs auf den Chromosomen III (Ewing *et al.*, 2000) und V (Oberhagemann *et al.*, 1999) kartieren in ähnlichen Positionen wie hier identifizierte QTLs für die Reife. In den Regressionsanalysen erwiesen sich diese beiden Loci als die dominierendsten: Der Locus auf KG III erklärte 8% der phänotypischen Varianz im Mittel aller drei Testjahre in der Escort x Leyla Population, und auf Chromosom V ergab sich beispielsweise mit einem Marker (BA213c14t3/268) in der Nikita x Leyla Population ein  $R^2$ -Wert von 30%.

Die Übereinstimmungen von QTLs für Resistenz und Reife lassen den Schluss zu, dass von diesen Loci direkte oder indirekte Einflüsse sowohl auf die Resistenz, als auch auf die Reife ausgehen. Ob es sich hierbei allerdings um jeweils dieselben Gene mit pleiotropen Effekten oder um Gene handelt, die lediglich eng gekoppelt sind, lässt sich bei der Auflösung der hier vorgenommenen QTL-Kartierungen nicht differenzieren.

Der Vergleich zwischen den QTLs für Resistenz und Reife zeigte aber weiterhin, dass es Loci gibt (auf den Chromosomen II, III, IV, V, VII, VIII, X und XII), die lediglich mit der Resistenz korrelieren und einen Locus (auf KG IX), welcher nur mit der Reife korreliert.

Zur weiteren Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Resistenz und Reife wurde in einem erstmals in Rahmen dieser Arbeit verwendeten Ansatz ein dritter Datensatz genutzt. Hierbei wurden die beiden zugrunde liegenden phänotypischen Datenreihen so zu dem Merkmal der **reifekorrigierten Resistenz** verrechnet, dass die Pflanzen jeweils in der phänotypischen Gesamtbetrachtung keine Korrelationen mehr zwischen beiden Zielmerkmalen aufwiesen. Mit diesem kombinierten Datensatz sollten somit Resistenz-QTLs identifiziert werden, welche nicht von dem Entwicklungsstand der Pflanzen beeinflusst waren. Insgesamt

konnten 10 signifikante QTLs für die reifekorrigierte Resistenz auf 8 Chromosomen detektiert werden (Tab. 3-15, Abb. 3-31). In der Korrelationsanalyse erwiesen sich die zwei genetisch nahe zusammen liegenden Loci auf KG II, die Region auf KG V und der QTL auf KG VIII als besonders wichtig. Die Stärke der Loci auf den Chromosomen II und V wurde auch durch die Regressionsanalyse bestätigt; so dass mit einem Modell für beide Testjahre durch eine Kombination dieser Loci 30% der phänotypischen Varianz erklärt werden konnten.

Interessant ist ein Vergleich dieser QTLs für die reifekorrigierte Resistenz mit den Ergebnissen der beiden zuvor beschriebenen Analysen. Erwartungsgemäß waren alle QTLs für die reifekorrigierte Resistenz auch bei den Analysen mit den unkorrigierten Resistenzdaten signifikant, wobei dieser Zusammenhang allerdings nicht umgekehrt galt (Tab. 3-15). Zunächst seien die 8 QTLs für die unkorrigierte Resistenz betrachtet, welche keine Korrelation mit der Reife gezeigt hatten. 5 dieser Loci (auf KG II, III, VII, VIII) zeigten ebenfalls signifikante Einflüsse auf die reifekorrigierte Resistenz. Dass hierbei teilweise, wie bei den zuvor bereits erwähnten starken QTLs auf KG II, die Effekte deutlicher wurden, lässt sich damit erklären, dass es nicht mehr zu Überlagerungen durch entwicklungsbedingte Resistenzbeobachtungen kam. Auffallend ist hingegen, dass es auch 3 Loci gibt (auf KG IV, X, XII), welche sich lediglich als QTLs für die unkorrigierte Resistenz erwiesen, nicht aber für die reifekorrigierte Resistenz, obwohl hier keine Korrelation mit der Reife festgestellt werden konnte. Dieses Phänomen könnte damit erklärt werden, dass zwischen diesen Resistenz-QTLs epistatische Wechselwirkungen mit anderen, reifebeeinflussenden Loci bestehen und somit die von diesen Resistenz-QTLs ausgehenden Effekte abhängig von dem Entwicklungsverlauf der Pflanze sind. Insgesamt 5 Loci (auf KG I, III, V, VI, X) zeigten Effekte bei allen drei phänotypischen Datenreihen. Bei diesen QTLs ist der zu erwartende Zusammenhang auszumachen, dass – aufgrund des gemeinsamen Einflusses auf Resistenz und Reife – schwächere Effekte bei der reifekorrigierten Resistenz als bei der unkorrigierten Resistenz festgestellt werden konnten. Dass allerdings dennoch Korrelationen mit reifekorrigierten Resistenzwerten zu identifizieren waren, zeigt, dass der Einfluss dieser Loci auf die Resistenzausprägungen nicht allein auf deren Beeinflussung der Entwicklung zurückgeführt werden können. Die Frage, ob es sich bei diesen Beobachtungen um pleiotrope oder Kopplungs-Effekte handelt, kann lediglich in der Region auf Chromosom V differenziert werden.

Mit insgesamt 16 SNP-Markern wurden in einem ca. 270 kb großen Contig auf Chromosom V zwischen den BAC-Enden BA47f2t3 und BA87d17t7 Genotypisierungsdaten für die QTL-Analysen erhoben. Dieser Abschnitt befindet sich in einem ca. 4 cM großen, nicht pathogenspezifischen **hot spot für Resistenz auf KG V** zwischen den RFLP Markern GP179 und GP21 (Abb. 3-2). In diesem Chromosomensegment wurden zwei *R*-Gene gegen den Kartoffelvirus X (Ritter *et al.*, 1991, De Jong *et al.*, 1997) und das *R1*-Gen (Kap. 1.3), sowie QTLs für Resistenz gegen *P. infestans* (Leonard-Schippers *et al.*, 1994; Oberhagemann *et al.*,

1999) und gegen den Wurzelnematoden *G. pallida* (Kreike *et al.*, 1994; Van der Voort *et al.*, 1998) identifiziert. Wie bereits mehrfach betont, wurden auch im Rahmen dieser Untersuchungen die durchgängig stärksten Effekte für alle drei Datenreihen in diese Region kartiert (Tab. 3-15). Von den getesteten 16 SNP-Markern zeigten lediglich 3 SNPs identische Segregation in der F1-Generation mit jeweils einem anderen SNP. Alle anderen wiesen sowohl unterschiedliche Segregationsmuster als auch verschiedene Korrelationen mit den Zielmerkmalen auf, anhand derer sie sich in vier Gruppierungen einteilen lassen. (1) Zwei Marker (von BA47f2) zeigten mit keinem der Merkmale signifikante Effekte. (2) Die meisten Marker korrelierten sowohl hochsignifikant mit der unkorrigierten Resistenz, als auch hochsignifikant mit der Reife, allerdings nur schwach mit der reifekorrigierten Resistenz. Die durch diese Marker repräsentierten Resistenzeffekte gehen also teilweise auf den Einfluss der Spätreife zurück. (3) Bei dem Marker BA76o11t7/144 und BA87d17t3/146 ist sogar der gesamte Effekt der Resistenz auf die Reife zurückzuführen, da Korrelationen mit unkorrigierter Resistenz und Reife, nicht aber mit reifekorrigierter Resistenz ermittelt wurden. (4) Die genau gegenteilige Beobachtung wurde bei den Markern auf Basis von BA76o11t3 gemacht. Es wurden hochsignifikante Korrelationen mit beiden Resistenzdatensätzen berechnet, aber keine Korrelationen mit der Reife festgestellt. Somit sind also diese Resistenzeffekte unabhängig von der Reifeentwicklung der Pflanze. Insgesamt zeigt sich also, dass in dieser Region mehrere Gene in verschiedenen allelischen Varianten, repräsentiert durch die Marker, mit unterschiedlichen Einflüssen auf die Zielmerkmale lokalisiert sein müssen.

Diese Differenzierung wird auch durch die Regressionsanalysen bestätigt. Beispielsweise wurden für das Jahr 2001 die Modelle für die reifekorrigierte und die unkorrigierte Resistenz mit jeweils einer Kombination aus 4 Markern aus der *hot spot* Region berechnet. Die Berücksichtigung mehrerer Marker dieser Region in den Modellen unterstreicht zunächst erneut, dass in dieser Region mehrerer Loci/Gene mit unterschiedlichen Einflüssen auf die Zielmerkmale vorhanden sind, da in ein Modell nur Marker eingehen, welche unabhängige und zusätzliche Informationen liefern. In den beiden Regressionsanalysen erklären diese Marker 55% der phänotypischen Varianz bei der unkorrigierten Resistenz, allerdings nur 41% bei der reifekorrigierten Resistenz. Diese Differenz spiegelt den durch die Reifeentwicklung bedingten Anteil dieser Region an der Resistenz wider.

Weiterhin ist festzustellen, dass die in dieser Region vorhandenen Loci in unterschiedlichen allelischen Variationen vorliegen. Dies wird zum einen indirekt durch die Vielzahl verschiedener Segregationsmuster, zum anderen aber auch durch das Vorhandensein von **tri-allelischen SNPs** verdeutlicht. So zeigte die Analyse des T-G-C-SNPs BA87d17t3/109, dass Resistenz und Reife lediglich mit dem Vorhandensein eines der drei allelischen Nukleotide, dem T-Allel, hochsignifikant korreliert ist (Tab. 3-14). Auch Ewing *et al.* (2000) identifizierten bei

einem QTL auf KG III 3 verschiedene Allele, wovon 2 einen signifikanten Einfluss auf die quantitative Resistenz zeigten.

Zusammenfassend lässt sich bezüglich des Zusammenhangs zwischen Reife und Resistenz – sowohl für die *hot spot* Region auf Chromosom V als auch für die genomweite Verteilung der QTLs – festhalten, dass es (1) Gene mit alleinigem Einfluss auf die Reife und solche mit alleinigem Einfluss auf die Resistenz gibt. Der Befund, dass – zumindest teilweise – unterschiedliche genetische Faktoren an der Ausprägung der beiden Merkmale beteiligt sind, wird auch durch einen Vergleich der phänotypischen Daten in den *cases* und *controls* bestätigt. So ist zwar eine deutlich zweipflige Verteilung bei den Resistenzdaten zu sehen (Abb. 3-26-b; Abb. 3-27-b), allerdings nicht bei den Reifedaten (Abb. 3-24-b). Diese Erkenntnis ist insbesondere für die angewandte Züchtung interessant, da bezüglich dieser Loci eine Trennung möglich scheint. (2) Es sind aber auch Indizien vorhanden, die für epistatische Wechselwirkungen sprechen, (3) und es konnten Hinweise auf pleiotrope Effekte festgestellt werden.

#### 4.3.2. Überlegungen zur genetischen Struktur quantitativer Resistenzgene

Bisher konnte noch kein quantitatives Resistenzgen kloniert und charakterisiert werden, und über die zugrunde liegenden molekularen und physiologischen Eigenschaften der quantitativen Resistenzreaktionen gibt es nur Hypothesen (Gebhardt und Valkonen, 2001).

**Resistenz-QTLs entsprechen Allelen von R-Genen?** Insgesamt 10 QTLs für Resistenz bzw. 8 Loci für reifekorrigierte Resistenz (Kap. 4.3.1.) konnten in Regionen mit RGLs detektiert werden. Robertson (1985, 1989) postuliert, dass qualitative Gene (MTLs) extreme allelische Varianten von quantitativen Genen (QTLs) darstellen. Diese Hypothese wird beispielsweise unterstützt durch Experimente von Beavis *et al.* (1991), die QTLs für die Pflanzengröße in Mais mit MTLs für dasselbe Merkmal assoziierten. In *Arabidopsis* wurden QTLs mit Einfluss auf die Blütenbildung in der physikalischen Nähe von entsprechenden mutierten MTLs lokalisiert (Koornneef *et al.*, 1998). Auch Analysen zu quantitativer Resistenz liefern Belege für diese These. So sind bei der Kartoffel eine Reihe von QTLs für Resistenzen gegen Nematoden und Bakterien mit Loci von R-Genen gekoppelt (Gebhardt und Valkonen, 2001). Leonard-Schippers *et al.* (1994) und Oberhagemann *et al.* (1999) detektierten QTLs gegen *P. infestans* in der Region des *R1*-Gens (Kap. 4.3.1.). Leister *et al.* (1996) und Shen *et al.* (1998) kartierten Sequenzhomologe bekannter R-Gene (RGLs) in Regionen mit identifizierten Resistenz-QTLs. Auf diesen Beobachtungen basiert die gewählte Strategie der hier durchgeführten QTL-

Analyse, als Kandidatengene RGLs zu nutzen (Kap. 1.6.1.). Somit müssen die folgenden Aussagen über die Struktur von quantitativen Resistenzgenen mit der Einschränkung betrachtet werden, dass hauptsächlich RGL-Regionen bei der Suche nach quantitativen Resistenzloci berücksichtigt worden sind. Dennoch sind die erwähnten Übereinstimmungen von QTLs und RGL-Regionen bemerkenswert. Sie liefern gute Indizien dafür, dass quantitative Resistenzgene den gleichen Genklassen angehören könnten wie *R*-Gene. Drei der detektierten QTLs unterstützen indirekt das Erklärungsmodell von Robertson: Wie bei Leonard-Schippers *et al.* (1994) und Oberhagemann *et al.* (1999) konnten auch bei dieser Untersuchung quantitative Effekte in der Nähe des *R1*-Locus auf Chromosom V festgestellt werden. Weiterhin wurden QTLs in ähnliche Positionen wie die qualitativen Gene gegen *P. infestans* *R<sub>ber</sub>* auf KG VIII (Ewing *et al.*, 2000) und *R<sub>b/c</sub>* auf KG X (Naess *et al.*, 2000) kartiert (vergl. Abb. 1-3 und Abb. 3-31). Bei den diesen QTLs zugrunde liegenden Genen könnte es sich also, entsprechend der Hypothese von Robertson, um allelische Varianten von *R*-Genen handeln. Allerdings können genannten Befunde auch damit erklärt werden, dass die quantitativen Resistenzgene in der physikalischen Nähe der *R*-Gene liegen. So wurden etwa bei molekularen Analysen der *R1*-Region weitere RGLs detektiert (Ballvora *et al.*, 2002).

**Pleiotrope Funktion von *R*-Genen.** Auch wenn im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden kann, ob es sich bei den quantitativen Resistenzgenen um Allele von *R*-Genen handelt oder sie diesen lediglich strukturell gleichen, so ist aufgrund der Befunde zumindest von einer ähnlichen Funktion auszugehen. Die Produkte der identifizierten QTLs könnten somit als Rezeptoren oder *downstream*-Komponenten in Signaltransduktionsketten fungieren (Kap. 1.3.).

In diesem Zusammenhang ist der pleiotrope Einfluss einiger QTLs in der Nähe von RGLs sowohl auf die Resistenz als auch auf Reife interessant (Kap. 4.3.1.). Aufgrund der gewählten Sonden zur Identifizierung der RGLs (Kap. 1.6.1.; Kap. 4.1.) ist eine strukturelle Analogie zu Domänen des Toll-Rezeptors bei *Drosophila* möglich (Whitham *et al.*, 1994; Leister *et al.*, 1996). Der Toll-Signalweg wurde ursprünglich bei der Regulation der embryonalen dorso-ventralen Polarität während der *Drosophila*-Entwicklung beschrieben (Review: Belvin und Anderson, 1996). Es zeigte sich aber auch, dass Mitglieder der Toll-Familie ebenfalls eine entscheidende Rolle bei der Immunantwort nach Infektionen bei *Drosophila* spielen (Review: Imler und Hoffmann, 2000). Analog oder sogar homolog konnte mittlerweile eine vergleichbare Doppelfunktion von Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLRs) in Säugerzellen nachgewiesen werden (Review: Kush und Lemaitre, 2000). Somit erscheint auch – in struktureller und funktioneller Analogie oder sogar Homologie – bei Pflanzen ein pleiotroper Einfluss von Rezeptorproteinen sowohl auf Abwehr- (= Resistenz) als auch auf Entwicklungsprozesse (= Reifeentwicklung) plausibel.

**Dosiseffekt.** Aufgrund der Möglichkeit des quantitativen Genotypisierens (Kap. 4.2.) konnte bei 4 mit RGLs gekoppelten Markern ein Dosiseffekt beobachtet werden, d. h., dass der Einfluss des QTLs auf das untersuchte Merkmal abhängig von der im individuellen Genotyp vorhandenen Allelfrequenz ist (Kap. 3.3.4.1.; Tab. 3-13). Wie bereits erläutert, ist es möglich, dass Produkte der QTLs als Rezeptoren mit Komponenten des Pathogens interagieren und eine Signaltransduktionskette auslösen. Hierbei könnte – unter der Annahme einer einfachen konstitutiven Regulation der QTL-Gene – die Menge der zur Verfügung stehenden Rezeptoren direkt abhängig von der Kopienzahl des Resistenz-vermittelnden Allels sein. Somit lässt sich spekulieren, dass eine ‚ausreichende‘ Erkennung des Pathogenbefalls erst ab einer bestimmten Konzentration der passenden Rezeptorvariante möglich ist. Ergänzend bzw. alternativ ist denkbar, dass die allelischen Produkte der QTLs um Interaktion mit den Erkennungskomponenten des Pathogens konkurrieren. Somit würden ebenfalls die ‚falschen‘ allelischen QTL-Produkte mit den Pathogenkomponenten interagieren und somit diese abfangen. Dementsprechend würden weniger Komplexe zwischen den ‚richtigen‘ QTL-Produkten und den Erkennungskomponenten gebildet, welche eine zur Resistenzreaktion führende Kaskade auslösen könnten.

**Hierarchische Ebenen der Resistenzreaktionen.** Im Rahmen der angenommenen Analogie zu qualitativen Resistenzreaktionen kommt den RGLs also wahrscheinlich bei der Erkennung und Signalweiterleitung eine Rolle in den oberen Hierarchieebenen der Resistenzreaktion zu (Hammond-Kosack und Jones, 1996).

Hierdurch könnten vielseitige Abwehrreaktionen reguliert werden, etwa die Induzierung von PR-Proteinen (*pathogenesis related*). So assoziierten Trognitz *et al.* (2002) mehrere Marker auf den Chromosomen III und XII mit Genen der allgemeinen Abwehrreaktionen. Obwohl im Rahmen dieser Arbeit primär RGL-Kandidatenregionen analysiert wurden, konnten mit SNP-Markern des Locus *4CL* ebenfalls signifikante Korrelationen eines PR-Gens mit der quantitativen Resistenz festgestellt werden. Trognitz *et al.* (2002) fanden allerdings in ihrer Kreuzungspopulation keine Assoziation mit diesem Gen, während Fritzeimer *et al.* (1997) zeigen konnten, dass *4CL* beim Befall mit *P. infestans* induziert wird. *4CL* codiert für eine 4-Coumarat: CoA-Ligase, welches als Schlüsselenzym des Phenylpropanstoffwechselweges an der Bildung von Phytoalexinen, Lignin und Ligninderivaten beteiligt ist. Diese Produkte werden nach Infektion mit *P. infestans* vermehrt in die Zellwände eingelagert (Elster *et al.*, 1996).

Somit könnten Gene unterschiedlicher Klassen auf verschiedenen Ebenen gemeinsam an der Ausbildung der quantitativen Resistenz gegen *P. infestans* beteiligt sein.

### 4.3.3. Beurteilung der gewählten Strategien zur Analyse von quantitativen Merkmalen

Die durchgeführte QTL-Analyse diene – neben der Untersuchung der quantitativen Resistenz gegen *P. infestans* – als Fallstudie zur Beurteilung der gewählten Strategien zur Analyse von komplexen Merkmalen.

**Candidate gene approach.** Zur Identifizierung von QTLs wäre eine genomweite Analyse der erstrebenswerteste Ansatz gewesen, da er ohne Annahmen auskommt (Kap. 1.4.2.). Für eine solche Analyse wären 10 000 bis 300 000 Marker<sup>5</sup> erforderlich gewesen. Ein solcher Analyseumfang war nicht realisierbar, da die Erhebung der Genotypisierungsdaten zu umfangreich wäre – trotz der zur Verfügung stehenden effektiven Genotypisierungsmethoden (Kap. 4.2.) – und da für eine genomweite Abdeckung nicht genügend Marker identifiziert sind – trotz der hohen Frequenz von SNP-Markern (Kap. 4.1.) Deshalb wurde bei dieser Arbeit ein *candidate gene approach* (Bryne und McMullen, 1996; Pflieger *et al.*, 2001; Kap. 1.4.2.) verfolgt. Mit der Fokussierung auf Kandidatengenregionen konnten erfolgreich QTLs detektiert werden (Kap. 4.3.1.) Aufgrund der getroffenen Vorauswahl kann allerdings nicht der Anspruch erhoben werden, alle Loci mit Einfluss auf das Zielmerkmal identifiziert zu haben (siehe auch Kap. 4.3.2.).

**Kopplungsanalysen mit cases und controls.** Die Genotypisierungsdaten wurden zunächst in den *cases* und *controls* erhoben. Vergleichbar mit Assoziationsstudien wurden also lediglich die Individuen einer Population mit extremen Merkmalssausprägungen analysiert (Kap. 1.4.2.). Auch Trognitz *et al.* (2002) hatten in einer QTL-Analyse zur Resistenz gegen *P. infestans* die Gruppe der analysierten Genotypen auf *cases* und *controls* beschränkt und konnten QTLs identifizieren (siehe Kap. 4.3.2.). Im Rahmen dieser Arbeit wurden allerdings 22 SNP bzw. Indels, welche signifikante Korrelationen mit den Zielmerkmalen bei der Untersuchung der ausgewählten Genotypen gezeigt hatten, ergänzend in den gesamten F1-Populationen genotypisiert. Hierbei zeigte sich allgemein, dass mit der *cases*-und-*controls*-Gruppe ermittelte Korrelationseffekte auch bei der Analyse der gesamten F1-Populationen festgestellt wurden (Tab. 3-15). Somit scheint die Kosten und Zeit ersparende Reduktion der Untersuchungsgruppe auf extreme Phänotypen ein sinnvoller Ansatz zu sein. Da jedoch bezüglich der *P*-Werte und *R*<sup>2</sup>-Werte Unterschiede festgestellt werden konnten, sollte bei interessanten QTLs zur Bestätigung bzw. zum Vergleich die gesamte Population betrachtet werden. So wurden bei den verschiedenen Gruppen teilweise unterschiedliche Signifikanzniveaus erreicht, allerdings ist dabei kein grundsätzlicher Trend zu beobachten; so sind sowohl Marker auszumachen, bei denen signifikantere Korrelationen mit den *cases*

<sup>5</sup> Diese Schätzung ergibt sich durch eine Übertragung von diskutierten Werten für das Humangenom (Collins *et al.*, 1999; Roberts, 2000) – das haploide Humangenom ist etwa 3-mal größer als das haploide Kartoffelgenom.

und *controls* berechnet wurden, als auch Marker, bei denen mit der gesamten F1-Population deutlichere Korrelationseffekte ermittelt wurden. Bezüglich der  $R^2$ -Werte ist allerdings durchgängig bei allen zu vergleichenden Analysen ein deutlicher Unterschied dahingehend festzustellen, dass die  $R^2$ -Werte bei der *cases-und-controls*-Gruppe erheblich größer waren als bei der gesamten F1-Population. Dieser Unterschied scheint auf die unterschiedliche Anzahl an untersuchten Genotypen zurückzuführen zu sein; so wurde auch in anderen Untersuchungen bei kleinen Untersuchungsgruppen von deutlich größeren  $R^2$ -Werten berichtet als bei umfangreicheren Populationen festgestellt werden konnten (Oberhagemann, 1997).

**SNP-Marker.** Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um die erste dokumentierte auf SNP-Markern beruhende QTL-Analyse in polyploiden Pflanzen. Ein besonderer Vorteil dieses Markertyps liegt in der hohen Frequenz. So konnten in allen Kandidatenregionen SNPs identifiziert werden (Kap. 4.1.). Entsprechend der gewählten Vorgehensweise (Kap. 1.6.1.) befanden sich die SNP-Marker nicht unbedingt in RGL-Genen selber, sondern in deren physikalischer Nähe (Tab. 9-11); hierin ist allerdings aufgrund von *linkage disequilibrium* kein Nachteil bei der Identifizierung von QTLs zu sehen (Johnson und Todd, 2000; Rich, 2000). Da RGLs großen Genfamilien (Kap. 4.1.) angehören, konnten durch die Analysen von Sequenzabschnitten außerhalb der RGL-Gene Probleme vermieden werden, welche durch das Vorhandensein von paralogen Sequenzen auftreten können. So konnten die Loci mit signifikanten Homologien zu bekannten Resistenzgenen meistens nicht erfolgreich analysiert werden (Kap. 3.1.2.; Tab. 9-11), da keine spezifischen Produkte amplifiziert werden konnten. SNP-Marker erwiesen sich insbesondere für die Analyse in einem polyploiden Organismus als vorteilhaft, da hiermit quantitative Genotypisierungen möglich waren (Kap. 4.2.) und dies über eine exaktere QTL-Analyse zu neuen Einsichten führte (Kap. 4.3.2.).

## 4.4. Ausblick

Wie der Abbildung 1-9 zu entnehmen ist, können bzw. werden Erkenntnisse und Erfahrungen aus den drei Kernbereichen dieser Arbeit in zukünftige Projekte eingehen.

**Identifizierten Polymorphismen.** Die genomweit detektierten RGL-Kandidatenregionen und vor allem die in diesen identifizierten SNPs und Indels stellen eine wichtige Informationsquelle für Untersuchungen von Pathogenresistenzen im Kartoffelgenom dar. Konkret werden auf Grundlage dieser Daten eine QTL-Analyse zur quantitativen Resistenz gegen den Wurzelnematoden *Globodera pallida* und eine weitere – ergänzend zu der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchung – zur Feldresistenz gegen die Kraut- und Knollenfäule erstellt werden. Die Eltern der für diese Analysen benötigten Kreuzungspopulationen befanden sich bereits unter den Genotypen, welche für die Identifizierung von allelischen Variationen in Pathogenresistenz vermittelnden Regionen genutzt worden waren (siehe Kap. 2.4.2.1.). Somit ist eine direkte Auswahl von geeigneten SNPs und Indels zur Erhebung von Genotypisierungsdaten in diesen Projekten möglich.

**Erfahrungen zum quantitativen Genotypisieren.** Im *Genomics*-Zeitalter kommt der Erhebung von Genotypisierungsdaten, insbesondere von SNPs, bei verschiedensten Studien und Anwendungen eine zentrale Bedeutung zu (Kwok, 2000). Hier bieten die Erfahrungen dieser Arbeit eine hilfreiche Grundlage bei der Auswahl geeigneter Methoden und deren Optimierungen. Darüber hinaus können die gewonnen Erkenntnisse zum quantitativen Genotypisieren nicht nur bei Arbeiten mit polyploiden Genomen genutzt werden, sondern auch bei der Bestimmung von Allelfrequenzen in gepoolten DNA-Proben, etwa bei Assoziationsstudien, Eingang finden.

**Erkenntnisse über die quantitative Resistenz gegen *P. infestans*.** Im Rahmen der QTL-Analyse konnten eine Reihe von SNPs identifiziert werden, die hochsignifikant mit dem Zielmerkmal der quantitativen Resistenz gegen *P. infestans* assoziiert sind. Hierbei ist besonders für die angewandte Züchtung die Erkenntnis interessant, dass sich unter diesen QTLs auch Loci befinden, die ausschließlich mit dem Merkmal der Resistenz, nicht aber mit der Reife korreliert sind. Somit bilden gerade diese Marker aussichtsreiche Kandidaten für einen Einsatz in der Praxis bei Marker-gestützter Selektion (*marker assisted selection*, MAS) (Young, 1999) mit dem Ziel der Züchtung von quantitativ resistenten, aber früher reifenden Sorten. Schließlich können die QTL-Daten als Grundlage zur erstmaligen Isolierung und Klonierung von quantitativen Resistenzgenen dienen, mit dem weiterführenden Zweck einer Funktionsanalyse und der quantitativer Komplementation.

## 5. Zusammenfassung

SNP-Marker wurden für die Analyse von Pathogenresistenzen bei der Kartoffel entwickelt. Mit diesem neuen Markersystem konnten hochsignifikant korrelierte Loci für quantitative Resistenz gegen *P. infestans* detektiert werden.

Es wurde die Strategie des *candidate gene approach* verfolgt: Um Regionen mit Kandidatengen zu identifizieren, wurde eine genomische BAC-Bibliothek der Kartoffel mit fünf Sonden *gescreent*, deren Sequenzen Homologien zu bekannten *R*-Genen des NBS-LRR-Typs aufwiesen. Insgesamt wurden 230 BAC-Klone mit RGL-Sequenzen (*resistance gene like*) detektiert, was auf eine große Anzahl an möglichen Resistenzgenen im Kartoffelgenom schließen lässt. Kartierungen der BAC-Insertionen zeigten eine genomweite Verteilung von Resistenzgenhomologen – lediglich auf zwei Kopplungsgruppen konnten keine RGLs ausgemacht werden – und deren Anordnung in Clustern.

In den RGL-Kandidatenregionen wurden allelische Sequenz-Variationen gesucht. Insgesamt wurden 81 Regionen mit einer Gesamtlänge von ca. 41 kb vergleichend in 28 verschiedenen Genotypen sequenziert. Dabei konnten 134 Indels und 1539 SNPs (Nukleotid-Diversität  $\pi = 7,4 \times 10^{-4}$ ) identifiziert werden. Es zeigte sich eine deutlich niedrigere Variabilität bei möglicherweise kodierenden Regionen als bei Regionen ohne Homologie zu bekannten Genen und bei RGL-Sequenzen. Die hohe Variabilität in RGL-Genen korrespondiert mit der diskutierten Rolle der Resistenzgenprodukte bei der Pathogenerkennung. Ein Vergleich zwischen di- und tetraploiden Kartoffelgenotypen offenbarte einen höheren Polymorphiegrad bei den (in der Regel) selbstinkompatiblen, diploiden Sorten.

Da im Rahmen dieser Arbeit erstmals SNP-Marker in polyploidem Pflanzenmaterial eingesetzt werden sollten, waren Evaluierungen und Optimierungen von geeigneten Genotypisierungsmethoden erforderlich. PCR-basierte Methoden und Primer-Elongation auf DNA-Chips erwiesen sich als ungeeignet. Allelspezifische Hybridisierungen auf DNA-Chips waren aufgrund geringer quantitativer Spezifität lediglich bedingt nutzbar. Die Enzym-basierten Methoden *BigDye-Sequencing*, *Minisequencing* (SNUPE in Kombination mit DHPLC) und *Pyrosequencing* ermöglichten quantitative Genotypisierungen unter Berücksichtigungen aller fünf möglichen Allelzustände in tetraploiden Organismen, allerdings waren mit jeder dieser Methoden spezifische Limitierungen und Nachteile verbunden.

Unter Nutzung der methodischen Erkenntnisse zur Genotypisierung und der in RGL-Kandidatenregionen identifizierten Polymorphismen wurde eine QTL-Analyse zur quantitativen Resistenz gegen *P. infestans* in zwei F1-Hybridpopulationen mit 89 Markern durchgeführt. Der ausgeprägt polygene Charakter dieses Merkmals wurde durch die Kartierung von QTLs in zwölf Chromosomensegmenten auf zehn Chromosomen mit den stärksten Effekten auf den Chromosomen II und V deutlich. Die erfolgreiche Identifizierung

von Resistenz-QTLs in RGL-Regionen unterstützt die der Arbeit zugrunde liegende Hypothese, dass quantitative Resistenzgene – bisher konnte noch kein quantitatives Resistenzgen kloniert und charakterisiert werden – den gleichen Genklassen wie qualitative Resistenzgene angehören. Aufgrund der quantitativen Genotypisierung konnte bei vier QTLs ein ‚Dosiseffekt‘ beobachtet werden, d.h., dass der Einfluss des QTLs auf das Merkmal abhängig von der im individuellen Genotyp vorhandenen Anzahl eines Alleles war.

Aufgrund der seit langem beschriebenen phänotypischen Kopplung zwischen quantitativer Resistenz und Spätreifung wurden ebenfalls Loci für das Merkmal ‚Reife‘ kartiert. Ein Vergleich der QTLs dieser beiden Loci legt nahe, dass es sowohl Gene mit alleinigem Einfluss auf die Reife als auch solche mit alleinigem Einfluss auf die Resistenz gibt. Weiterhin konnten Indizien für epistatische Wechselwirkungen zwischen Loci dieser beiden Merkmale und Hinweise auf pleiotrope Effekte festgestellt werden.

## 6. Abstract

For the analysis of pathogen resistance in potato, new markers based on single nucleotide polymorphisms (SNPs) were developed. QTL mapping revealed SNPs that were significantly correlated to loci for quantitative resistance to *P. infestans*.

Following the strategy of the *candidate gene approach*, regions with candidate genes were detected by using five different probes with sequence similarity to *R*-genes (NBS-LRR type) for screening a genomic BAC library. In total, 230 positive BAC clones carrying RGLs (resistance gene like sequences) were isolated, suggesting a high number of resistance genes present in the potato genome. By mapping the BAC insertions, a genome wide distribution of resistance gene homologues became obvious: homologues were found in ten out of twelve linkage groups. Moreover, the RGLs seemed to be mostly organized in clusters.

For the identification of allelic variation in these RGL-candidate-regions, 81 of the regions with a total length of ca. 41 kb were comparatively sequenced in 28 different genotypes, leading to the identification of 134 insertions/deletions (indels) and 1539 SNPs (nucleotide diversity  $\pi = 7,4 \times 10^{-4}$ ). As expected, diversity was lower in putative coding regions when compared with regions without homology to known genes, but also when compared with RGL-sequences. This observation corresponds with the idea that resistance genes are involved in pathogen recognition. A comparison between diploid genotypes and tetraploid cultivars revealed that the diploids were more polymorphic, probably due to self-incompatibility and absence of inbreeding.

The present study is the first application of SNP-markers in polyploid species. Thus, the evaluation and optimization of genotyping methods for this purpose was required. PCR-based methods and primer-elongation on DNA-chips were found to be not suitable. Allel-specific hybridization on microarrays showed insufficient quantitative accuracy. *BigDye*-sequencing, minisequencing (single nucleotide primer extension in combination with DHPLC) und pyrosequencing appeared to be appropriate methods for quantitative genotyping of SNPs in polyploid species, as it was possible to distinguish not only between homo- and heterozygosity, but also between the three different heterozygous states. Nevertheless, all three methods suffer from specific limitations and shortcomings.

Applying the knowledge about precise genotyping in polyploid plant material and exploiting the SNPs identified in RGL-regions, genetic dissection of quantitative resistance to *P. infestans* were pursued in two F1 hybrid families. QTL analysis with 89 markers identified twelve segments on ten chromosomes having an impact on the resistance, revealing the highly polygenic character of this trait. The most prominent effects were detected on chromosomes II and V. The successful identification of quantitative resistance loci in regions with RGLs supports the hypothesis that genes underlying quantitative resistance belong to the same gene family as qualitative resistance genes (*R*-genes). As three QTLs were

mapped close to known *R*-genes for resistance to *P. infestans*, it is even possible that quantitative resistance genes are alleles at qualitative resistance loci. Due to the accurate genotyping, dose-effects were uncovered, indicating that the influence of QTLs on the trait depends on the dosage of the allele present at an individual QTL.

It has long been observed that quantitative resistance to late blight is associated with late maturity. To dissect the genetic causes underlying this association, loci affecting maturity were also mapped. Comparing the QTLs of the two traits of interest, it became evident that there are genes with effects on just one of either trait, and that there might be epistatic and pleiotropic effects between both.

## 7. Literatur

- Agrios, G.N.: Plant Pathology. Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto, Fourth Edition (1997).
- Ahmadian, A., B. Gharizadeh, A.C. Gustafsson, F. Sterky, P. Nyren, M. Uhlen and J. Lundeberg.: Single-nucleotide polymorphism analysis by pyrosequencing. *Anal. Biochem.* 280:103-110 (2000).
- Alderborn, A., A. Kristofferson and U. Hammerling.: Determination of single nucleotide polymorphisms by real-time pyrophosphate DNA sequencing. *Genome Res.* 10:1249-1258 (2000).
- Anderson P. A., Lawrence G. J., Morrish B. C., Ayliffe M. A., Finnegan E. J. and Ellis J. G.: Inactivation of the flax rust resistance gene *M* associated with loss of a repeated unit within the leucine-rich repeat coding region. *Plant Cell* 9, 641-651 (1997).
- Ballvora, A., Hesselbach, J., Niewöhner, J., Leister, D., Salamini, F. and Gebhardt, C.: Marker enrichment and high-resolution map of the segment of potato chromosome VII harbouring the nematode resistance gene *Gro1*. *Mol. Gen. Genet.* 249, 82-90 (1995).
- Ballvora, A., Ercolano, M. R., Weiß, J., Meksem, K., Bormann, C., Oberhagemann, P., Salamini, F. and Gebhardt, C.: The *R1* Gene for Potato Resistance to Late Blight (*Phytophthora infestans*) belongs to the Leucine Zipper/NBS/LRR Class of Plant Resistance Genes. *Plant Journal*, in press (2002).
- Barcellos, L.F., Klitz, W., Field, L.L., Tobias, R., Bowcock, A.M., Wilson, R. et al.: Association mapping of disease loci, by use of a pooled DNA genomic screen. *Am J Hum Genet* 61:734-47 (1997).
- Barton, N.H., Keightley, P.D.: Understanding quantitative genetic variation. *Nat Rev Genet* 3 (1):11-21 (2002).
- Beavis, W.D., Grant, D., Albertsen, M., and Fincher, R.: Quantitative trait loci for plant height in four maize populations and their association with qualitative genetic loci. *Theor. Appl. Genet.* 83:141-145 (1991).
- Belvin, M.P., and Anderson, K.V.: A conserved signaling pathway: the Drosophila toll-dorsal pathway. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 12:393-416 (1996).
- Bent, A. F., Kunkel, B. N., Dahlbeck, D., Brown, K. L., Schmidt, R., Giraudat, J., Leung, J. and Staskawicz, B. J.: *RPS2* of *Arabidopsis thaliana*: A Leucine-Rich Repeat Class of Plant Disease Resistance Genes. *Science* 265, 1856-1860 (1994).
- Bent, A.F.: Plant disease resistance genes: function meets structure. *Plant Cell* 8: 1757-1771 (1996).
- Benters, R., Niemeyer, C.M., Drutschmann, D., Blohm, D., Wöhrle, D.: DNA microarrays with PAMAM dendritic linker systems. *Nucleic Acids Research* 30 (2): e10 (2002).
- Bonierbale M, Plaisted RL, Tanksley SD.: RFLP maps based on a common set of clones reveal modes of chromosomal evolution in potato and tomato. *Genetics* 120: 1095-103 (1988).
- Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW.: Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32: 314-31 (1980).
- Bottema, C.D.K., G. Sarkar, J.D. Cassay, S. li, C.M. Dutton and S.S. Sommer.: PCR-amplification of specific alleles: A general method of rapidly detecting mutations, polymorphisms, and haplotypes. *Meth. Enzymol.* 218: 388-402 (1993).
- Botella, M. A., Parker, J. E., Frost, L. N., Bittner-Eddy, P. D., Beynon, J. L., Daniels, M. J., Holub, E. B. and Jones, J. D. G.: Three Genes of the Arabidopsis *RPP1* Complex Resistance Locus Recognize Distinct *Peronospora parasitica* Avirulence Determinants. *Plant Cell* 10, 1847-1860 (1998).
- Bournival, B. L., Vallejos, C. E. and Scott, J. W.: An isozyme marker for resistance to race 3 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in tomato. *Theor. Appl. Genet.* 78, 489-494 (1989).
- Brodie, B. B.: Potato. In: Plant nematode interactions. Edited by Barker, K. R., Pederson, G. A. and Windham, G. L.. American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., and Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wis. Agronomy 36, 567-594 (1998).
- Byrne, P.F. and McMullen, M.D.: Defining genes for agricultural traits: QTL analysis and the candidate gene approach. *Probe* 7:24-27 (1996).
- Cargill, M., Altshuler, D., Ireland, J., Sklar, P., Ardlie, K., Patil, N., Lane, C.R., Lim, E.P., Kalyanaraman, N., Nemesh, J., Ziaugra, L., Friedland, L., Rolfe, A., Warrington, J., Lipshutz, R., Daley, Q., and Lander, E.: Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nature Genet.* 22:231-238 (1999).
- Chang, R.-Y., O'Donoghue, L. S. and Bureau, T. E.: Inter-MITE polymorphisms (IMP): a high throughput transposon-based genome mapping and fingerprinting approach. *Theor. Appl. Genet.* 102, 773-781 (2001).
- Chee, M., R. Yang, E. Hubbell, A. Berno, X.C. Huang, D. Stern, J. Winkler, D.J. Lockhart, M.S. Morris and S.P. Fodor.: Accessing genetic information with high-density DNA arrays. *Science* 274:610-614 (1996).
- Chen X, Salamini F, Gebhardt C: A potato molecular function map for carbohydrate metabolism and transport. *Theor Appl Genet*, 102:284-95 (2001).
- Chen, X., Knowk, P.Y.: Template-directed dye-terminator incorporation (TDI) assay: a homogeneous DNA diagnostic method based on fluorescence resonance energy transfer. *Nucleic Acids Res* 25:347-353 (1997).
- Cho, R.J., M. Mindrinos, D.R. Richards, R.J. Sapolisky, M. Anderson, E. Drenkard, J. Dewdney, T.L. Reuber, M. Stammers, N. Federspiel, A. Theologis, W.H. Yang, E. Hubbell, M. Au, E.Y. Chung, D. Lashkari, B. Lemieux, C. Dean, R.J. Lipshutz, F.M. Ausubel, R.W. Davis and P.J. Oefner.: Genome-wide mapping with biallelic markers in Arabidopsis thaliana. *Nature Genet.* 23:203-207 (1999).
- Collins FS, Guyer MS, Chakravarti A.: Variations on a theme: Cataloging human DNA sequence variation. *Science* 278: 1580-81 (1997).
- Collins, A., Lonjou, C., Morton, N.E.: Genetic epidemiology of single-nucleotide polymorphisms. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 96: 15173-15177 (1999).
- Comings, D.E., and MacMurray, J.P.: Molecular Heterosis: A Review. *Mol Genet. Meta.* 71:19-31 (2000).
- Cooke, D. E. L., Drenth, A., Duncan, J. M., Wagels, G. and Brasier, C. M.: A Molecular Phylogeny of Phytophthora and Related Oomycetes. *Fungal Genetics and Biology* 30, 17-32 (2000).
- Cruickshank, G., Stewart, H.E., Wastie, R.L.: An illustrated assessment key for foliage blight of potatoes. *Potato Res.* 25: 213-214 (1982).
- Darlington, C.D.: Chromosome behaviour and structural hybridity in the Tradescandiae. *J. Genet.* 21:207-286
- De Jong W, Forsyth A, Leister D, Gebhardt C, Baulcombe DC.: A potato hypersensitive resistance gene against potato virus X maps to a resistance gene cluster on chromosome V. *Theor Appl Genet* 95: 246-252 (1997).
- Doerge, R.W., and Craig, B.A.: Model selection for quantitative trait locus analysis in polyploids. *PNAS* 97 (14): 7951-7956 (2000).
- Doerge, R.W.: Mapping and analysis of quantitative trait loci in experimental populations. *Nat Rev Genet* Jan;3(1):43-52 (2002).
- Dunwell JM, Sunderland N.: Anther culture of *Solanum tuberosum* L. *Euphytica* 22: 317-23. (1973).
- Durrant, W. E., Rowland, O., Piedras, P., Hammond-Kosack, K. E. and Jones, J. D. G.: cDNA-AFLP Reveals a Striking Overlap in RACE-Specific Resistance and Wound Response Gene Expression Profiles. *Plant Cell* 12, 963-977 (2000).
- Ellis, J., Dodds, P., and Pryor, T.: Structure, function and evolution of plant disease resistance genes. *Curr. Opin. Plant Biol* 3(4):278-84 (2000)
- Ellis, M.C.: 'Spot-On' SNP Genotyping. *Genome Research* 10(7):895-897 (2000).
- Elster, E.F., Oßwald, W., and Schneider, I.: Phytopathologie, 173ff. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg (1996).
- Erdogan, F., Kirchner, R., Mann, W., Ropers, H.-H., Nuber, U.A.: Detection of mitochondrial single nucleotide polymorphisms using a primer elongation reaction on oligonucleotide microarray. *Nucleic Acids Research* 29 (7):e36 (2001).
- Ewing, E.E., Simko, I., Smart, C.D., Bonierbale, M.W., Mizubuti, E.S.G., et al.: Genetic mapping from field tests of quantitative and qualitative resistance to *Phytophthora infestans* in a population derived from *Solanum tuberosum* and *Solanum berthaultii*. *Mol. Bree.* 6:25-36 (2000).
- Fan, J.B., X. Chen, M.K. Halushka, A. Berno, X. Huang, T. Ryder, R.J. Lipshutz, D.J. Lockhart and A. Chakravarti.: Parallel genotyping of human SNPs using generic high-density oligonucleotide tag arrays. *Genome Res.* 10:853-860. (1999).
- Feinberg, A. P. and Vogelstein, B.: A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132, 6-13 (1983).
- Feinberg, A. P. and Vogelstein, B.: A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. (Addendum) *Anal. Biochem.* 137, 266-267 (1984).
- Feys, B. J. and Parker, J. E.: Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. *Trends Genet.* 16, 449-455 (2000).
- Flint, J., Mott, R.: Finding the molecular basis of quantitative traits: success and pitfalls. *Nat Rev Genet* 2(6): 437-45 (2001).
- Flor, H. H.: Current status of gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* 9, 275-296 (1971).

- Forrest, J. M. S., Robertson, W. M. and Trudgill, D. L.: Mass re-emergence of potato cyst nematode juveniles from roots of resistant potatoes – possible involvement of surface sugar moieties. In: Abstracts of Papers, Crop Protection in Evolving Agriculture. University of Reading, Association of Applied Biologists, Reading, 25-27 September (1984).
- Frey W., Goodwin S., Dyer A., Matuszak J., Drenth A., Tooley P., Suijkowski L., Koh Y., Cohen B., Spielman L., Deahl K., Inglis D. and Sandlan K.: Historical and recent migrations of *P. infestans*: chronology and implications. *Plant Disease* 77:653-661 (1993).
- Fridman, E., Pleban, T., and Zamir, D.: A recombination hotspot delimits a wild-species quantitative trait locus for sugar content to 484 bp within an invertase gene. PNAS 97(9): 4718-4723 (2000).
- Fritzemeyer, K.-H., Cretin, C., Kombrink, E., Rohwer, F., Taylor, J., Scheel, D., and Halbrock, K.: Transient induction of Phenylalanine Ammonia-Lyase and 4-Coumarate: CoA ligase mRNAs in potato leaves with virulent or avirulent races of *P. infestans*. *Plant Physiol.* 85:34-41 (1987).
- Fry, W.E., and Apple, A.E.: Disease management implications of age-related changes in susceptibility of potato foliage to *Phytophthora infestans*. *Am Potato J* 63: 47-56 (1986).
- Futuyma, D.J.: Evolutionary Biology. 2<sup>nd</sup> Ed, Sinauer (1986).
- Gardner, E.J., and Snustad, D.P.: Principles of Genetics, 6<sup>th</sup> ed, New York, NY: Wiley (1981).
- Geldermann, H.: Investigations on inheritance of quantitative characters in animals by gene markers. I. Methods. *Theor Appl Genet* 46:319-330 (1975).
- Gebhardt, C., Ritter, E., Debener, T., Schachtschabel, U., Walkemeier, B., Uhrig, H. and Salamini, F.: RFLP analysis and linkage mapping in *Solanum tuberosum*. *Theor. Appl. Genet.* 78, 65-75 (1989).
- Gebhardt, C., Ritter, E., Barone, A., Debener, T., Walkemeier, B., Schachtschabel, U., Kaufmann, H., Thompson, R. D., Bonierbale, M. W., Ganai, M. W., Tanksley, S. D. and Salamini, F.: RFLP maps of potato and their alignment with the homoeologous tomato genome. *Theor. Appl. Genet.* 83, 49-57 (1991).
- Gebhardt, C.: Plant genes for pathogen resistance – variation on a theme. *Trends Plant Sci.* 2:243-244 (1997).
- Gebhardt C, Ritter E, Salamini F.: RFLP map of the potato. In *DNA-based markers in plants*, 2<sup>nd</sup> edition, ed. Phillips RL, Vasil IK. Advances in Cellular and Molecular Biology of Plants. Dordrecht/Boston/London: Kluwer Academic Publishers, in press. (2001).
- Gebhardt, C. and Valkonen, J. P. T.: Organization Of Genes Controlling Disease Resistance In The Potato Genome. *Annu. Rev. Phytopathol.* 39, 79-102 (2001).
- Germer, S., and R. Higuchi.: Single-tube genotyping without oligonucleotide probes. *Genome Res.* 9:72-78 (1999).
- Germer, S., Holland, M.J., and Higuchi, R.: High-throughput SNP allele-frequency determination in pooled DNA samples by kinetic PCR. *Genome Res.* 10:258-266 (2000).
- Ghislain M., Trognitz B., Herrera M., Solis J. Casallo G., Vasquez C., Hurtado O., Castillo R. Portal L and Orillo M.: Genetic loci associated with field resistance to late blight in offspring of *Solanum phureja* and *S. tuberosum* grown under short-day conditions. *Theor Appl Genet* 103:433-442 (2001).
- Giordano, M., M. Mellai, B. Hoogendoorn and P. Momigliano-Richiardi.: Determination of SNP allele frequencies in pooled DNAs by primer extension genotyping and denaturing high-performance liquid chromatography. *J. Biochem. Biophys. Methods* :101-110. (2001).
- Glazebrook, J.: Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis*. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2, 280-286 (1999).
- Goodwin S., Cohen B. and Fry W.: Panglobal distribution of a single clonal lineage of the Irish potato famine fungus. *Proc Nat Acad Sci USA* 91:11591-11595 (1994).
- Goovers F.: Misclassification of pest as 'fungus' puts vital research on wrong track. *Nature* 411:633 (2001).
- Grant, M. R., Godiard, L., Straube, E., Ashfield, T., Lewald, J., Sattler, A., Innes, R. W. and Dangl, J. L.: Structure of the *Arabidopsis RPM1* gene enabling dual specificity disease resistance. *Science* 269, 843-846 (1995).
- Gut, I.G.: Automation in Genotyping of Single Nucleotide Polymorphisms. *Hum. Mut* 17:475-492 (2001).
- Hall, J.G., P.S. Eis, S.M. Law, L.P. Reynaldo, J.R. Prudent, D.J. Marshall, H.T. Allawi, A.L. Mast, J.E. Dahlberg, R.W. Kwiatkowski, M. de Arruda, B.P. Neri and V.I. Lyamichev.: Sensitive detection of DNA polymorphisms by the serial invasive signal amplification reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:8272-8277 (2000).
- Halushka, M.K., Fan, J.-B., Bentley, K., Hsie, L., Shen, N., Weder, A., Cooper, R., Lipshutz, R., and Chakravarti, A.: Patterns of single-nucleotide polymorphisms in candidate genes for blood-pressure homeostasis. *Nature Genet.* 22:239-247 (1999).
- Haff, L.A. and Smirnov, I.P.: Single-nucleotide polymorphism identification assays using a thermostable DNA polymerase and delayed extraction MALDI-TOF mass spectrometry. *Genome Res.* 7:378-388 (1997).
- Harrison, J.G., Lowe, R., and Williams, N.A.: Effects of temperature and light on non-race-specific resistance of potato leaflets to late blight. *Plant Pathology* 43:733-739 (1994).
- Hawkes, J.G.: The Potato, Evolution, Biodiversity and Genetic Resources. London: Belhaven (1990)
- Hawkes, J.G.: Origins of Cultivated Potatoes and Species Relationship. In: Potato Genetics. Edited by Bradshaw, J.E., and Mackay, G.R., Cab International, Wallingford. 3-43 (1994).
- Hammond-Kosack, K. E. and Jones, J. D. G.: Resistance Gene-Dependent Plant Defense Response. *Plant Cell* 8, 1773-1791 (1996).
- Hammond-Kosack, K. E. and Jones, J. D. G.: Plant Disease Resistance Genes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48, 575-607 (1997).
- Hehl, R., Faurie, E., Hesselbach, J., Salamini, F., Whitham, S., Baker, B. and Gebhardt, C.: TMV resistance gene *N* homologues are linked to Synchronytrium endobioticum resistance in potato. *Theor. Appl. Genet.* 98, 379-386 (1998).
- Helentjaris, T., Heun, M.: Analysis of Traits With Complex Inheritance in Maize Using Molecular Markers. In: Freeling, M., Walbot, V. (eds.): The Maize Handbook. Springer-Verlag, New York, Inc. (1994).
- Hermesen JGTh, Verdenius J.: Selection from *Solanum tuberosum* group phureja of genotypes combining high-frequency haploid induction with homozygosity for embryo spot. *Euphytica* 22: 244-59 (1973).
- Hieter, P., and Griffiths, T.: Polyploidy – More Is More or Less. *Science* 285(5425):251-4 (1999).
- Higgins, D.G. and Sharp, P.M.: CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignments on a microcomputer. *Gene*, 73:237-244 (1988).
- Hillis, D.M. (Hrsg.): Molecular Systematics. Sunderland, Sinauer (1990).
- Hoffmann, G. M. und Schmutterer, H.: Schädlinge. In: Parasitäre Krankheiten und Schädlinge an wirtschaftlichen Kulturpflanzen. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart. 244-266 (1983).
- Hoogendoorn, B., M.J. Owen, P.J. Oefner, N. Williams, J. Austin and M.C. O'Donovan.: Genotyping single nucleotide polymorphisms by primer extension and high performance liquid chromatography. *Hum. Genet.* 104:89-93 (1999).
- Hoogendoorn, B., N. Norton, G. Kirov, N. Williams, M.L. Hamshere, G. Spurlock, J. Austin, M.K. Stephens, P.R. Buckland, M.J. Owen and M.C. O'Donovan.: Cheap, accurate and rapid allele frequency estimation of single nucleotide polymorphisms by primer extension and DHPLC in DNA pools. *Hum. Genet.* 107:488-493 (2000).
- Hougas RW, Peloquin SJ, Gabert AC.: Effect of seed parent and pollinator on the frequency of haploids in *Solanum tuberosum*. *Crop Sci* 4: 593-95 (1964).
- Huang, M.M., Arnheim, N., and Goodman, M.F.: Extension of base mispairs by *Taq* DNA polymerase: implications for single nucleotide discrimination in PCR. *Nucleic Acids Res.* 20:4567-4573 (1992).
- Huber, M., Losert, D., Hiller, R., Harwanegg, C., Mueller, M.W., Schmidt, W.M.: Detection of Single Base Alterations in Genomic DNA by Solid Phase Polymerase Chain Reaction on Oligonucleotide Microarrays. *Analytical Biochemistry* 299: 24-30 (2001).
- Imler, J.L., and Hoffmann, J.A.: Toll and Tol-like proteins: an ancient family of receptor signaling infection. *Rev Immunogenet.* 2(3):294-304 (2000).
- Jacobs JME, Van Eck HJ, Arens P, Verkerk-Bakker B, te Lintel Hekkert B, Bastiaanssen HJM, ElKharbotly A, Pereira A, Jacobsen E, Stiekema WJ.: A genetic map of potato (*Solanum tuberosum*) integrating molecular markers, including transposons, and classical markers. *Theor Appl Genet* 91: 289-300 (1995).
- Jalanko, A., J. Kere, E. Savilahti, M. Schwartz, A. Syvanen, M. Ranki and H. Soderlund.: Screening for defined cystic fibrosis mutations by solid-phase minisequencing. *Clin. Chem.* 38:39-43 (1992).
- Jeger, M.J., Viljanen-Rollinson S.L.H.: The use of the area under the disease-progress curve (AUDPC) to assess quantitative disease resistance in crop cultivars. *Theor Appl Genet* 102:32-40 (2001).
- Johal, G. S. and Briggs, S. P.: Reductase activity encoded by the *HM1* disease resistance gene in maize. *Science* 258, 985-987 (1992).
- Johannsen, W.: Elemente der exakten Erblichkeitslehre. Fischer, Jena (1909).
- Johnson, G.C. and Todd, J.A.: Strategies in complex disease mapping. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10:330-34 (2000).

- Jones, D. A., Thomas, M. C., Hammond-Kosack, K. E., Balint-Kurti, P. J. and Jones, J. D. G.: Isolation of the Tomato *Cf-9* Gene for Resistance to *Cladosporium fulvum* by Transposon Tagging. *Science* 266, 789-793 (1994).
- Jones, D. A. and Jones, J. D. G.: The Role of Leucine-Rich Repeat Proteins in Plant Defense. *Adv. Bot. Res.* 24, 89-167 (1997).
- Jones, J. D. G., Shlumukov, L., Carland, F., English, J., Scofield, S. R., Bishop G. J. and Harrison K.: *Transgenic Research* 1, 285-297 (1992).
- Kalendar, R., Grob, T., Regina, M., Suoniemi, A. and Schulman, A.: IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. *Theor. Appl. Genet.* 98, 704-711 (1999).
- Kamoun S.: Nonhost resistance to *P. infestans*: novel prospects for a classical problem. *Current Opinion in Plant Biology* 4:295-300 (2001).
- Kearsey, M.J., Farquhar, A.G.: QTL-Analysis in plants; where are we now? *Heredity* 80(2): 137-42 (1998).
- Keen, N. T.: The molecular biology of disease resistance. *Plant Mol. Biol.* 19, 109-122 (1992).
- Knogge, W.: Fungal Infection of Plants. *Plant Cell* 8, 1711-1722 (1996).
- Kobe, B. and Deisenhofer, J.: The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. *Trends Biochem. Sci.* 19, 415-421 (1994).
- Koornneef, M., Alonso-Blanco, C., Peeters, A.J.M., and Soppe W.: Genetic control of flowering time in *Arabidopsis*. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49:345-370 (1998).
- Kreike CM, De Koning JRA, Vinke JH, Van Ooijen JW, Stiekema WJ.: Quantitatively-inherited resistance to *Globodera pallida* is dominated by one major locus in *Solanum spegazzinii*. *Theor Appl Genet* 88: 764-69 (1994).
- Kunze, R., Saedler, H. and Lönnig, W.-E.: Plant Transposable Elements. *Adv. Bot. Res.* 27, 331-470 (1997).
- Kuppuswamy M.H., Hoffmann, J.W., Kasper, C.K., Spitzer, S.G., Groce, S.L., and Bajaj, S.P.: Single nucleotide primer extension to detect genetic diseases: experimental application to hemophilia B (factorIX) and cystic fibrosis genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:1143-7 (1991).
- Kush, R.S., and Lemaître, B.: Genes that fight infection: what the *Drosophila* genome says about animal immunity. *Trends in Genetics* 16:442-449 (2000).
- Kwok, P.Y., C.Carlson, T.D. Yager, W. Ankener and D.A. Nickerson.: Comparative analysis of human DNA variations by fluorescence-based sequencing of PCR products. *Genomics* 23:138-144 (1994).
- Kwok, P.Y.: Approaches to allele frequency determination. *Pharmacogenomics* 1(2): 231-235 (2000).
- Kwok, P.Y.: Methods for Genotyping Single Nucleotide Polymorphisms. *Ann. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2:235-58 (2001).
- Landegren, U., R. Kaiser, J. Sanders and L. Hood.: A ligase-mediated gene detection technique. *Science* 241:1077-1080 (1988).
- Lander, E.S., and Schork, N.J.: Genetic dissection of complex traits. *Science* 265: 2037-2048 (1994).
- Lawrence, G. J., Finnegan, E. J., Ayliffe, M. A. and Ellis, J. G.: The *L6* gene for flax rust resistance is related to the *Arabidopsis* bacterial resistance gene *RPS2* and the tobacco viral resistance gene *N*. *Plant Cell* 7, 1195-1206 (1995).
- Leister, D.: Isolierung von Genomsegmenten aus der Kartoffel, die mit den Resistenzloci *R1* und *Gro1* gekoppelt sind, mit Hilfe von positioneller Klonierung und heterologer PCR, Doktorarbeit an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen (1995).
- Leister, D., Ballvora, A., Salamini F. and Gebhardt, C.: A PCR-based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plants. *Nature Genetics* 14, 421-429 (1996).
- Leonards-Schippers, C., Gieffers, W., Schäfer-Pregl, R., Ritter, E., Knapp, S. J., Salamini, F. and Gebhardt, C.: Quantitative Resistance to *Phytophthora infestans* in Potato: A Case Study for QTL Mapping in an Allogamous Plant Species. *Genetics* 137, 67-77 (1994).
- Lindblad-Toh, K., Winchester, E., Daly, M.J., Wang, D.G., Hirschhorn, J.N., Lavolette, J.P., Ardlie, K., Reich, D.E., Robinson, E., Sklar, P., Shah, N., Thomas, D., Fan, J.B., Gingeras, T., Warrington, J., Patil, N., Hudson, T.J., and Lander, E.S.: Large-scale discovery and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the mouse. *Nature Genet.* 24:381-386 (2000).
- Little, D.P., Braun, A., Darnhofer-Demar, B., Frilling, A., Li, Y., McIver, R.T., Köster, H.: Detection of RET protooncogene codon 634 mutations using mass spectrometry. *J Mol Med* 75: 745-750 (1997).
- Li, W.-H., and Sadler, L.A.: Low nucleotide diversity in man. *Genetics* 129:513-523 (1991).
- Li, W.-H.: *Molecular Evolution*. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Mass. (1997)
- Liu, Q., E.C. Thorland, and S.S. Sommer.: Inhibition of PCR amplification by a point mutation downstream of a primer. *BioTechniques* 22:292-296 (1997).
- Livak, K.J., S.J. Flood, J. Marmaro, W. Giusti and K. Deetz.: Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridisation. *PCR Methods Appl.* 4:357-362. (1995).
- Livak, K.J.: Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay. *Genet. Anal.* 14: 143-49 (1999).
- Li, X., van Eck, H.J., Rouppe van der Voort, J., Huigen, D.J., Tam, P., et al: Autotetraploids and genetic mapping using common AFLP markers: the *R2* allele conferring resistance to *Phytophthora infestans* mapped on potato chromosome 4. *Theor. Appl. Genet.* 96:1121-28 (1998).
- Long, A.D., Lyman, R.F., Langley, C.H., and Mackay, T.F.C.: Two sides in the Delta gene region contribute to naturally occurring variation in bristle number in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 149:999-1017 (1998).
- Malcolmson, J.F., Black, W.: New R genes in *Solanum demissum* Lindl. and their complementary races of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. *Euphytica* 15: 199-203 (1966).
- Maldonado, L.A., Wright, J.E. and Scott, G.J.: Constraints to production and use of potato in Asia. *Amer. J. of Potato Res.* 75:71-79 (1998).
- Mackay, T.F.: The genetic architecture of quantitative traits. *Ann Rev Genet* 35: 303-339 (2001).
- Marczewski W., Flis, B., Syller J., Schäfer-Pregl R., Gebhardt C.: A major QTL for resistance to *Potato leafroll virus* (PLRV) is located in a resistance hotspot on potato chromosome XI and is tightly linked to *N*-gene-like markers. *Mol Plant Microbe Interactions* 14: 1420-1425. (2001).
- Meyer RC, Milbourne D, Hackett CA, Bradshaw JE, McNichol JW, Waugh R.: Linkage analysis in tetraploid potato and association of markers with quantitative resistance to late blight (*Phytophthora infestans*). *Mol Gen Genet* 259: 150-60 (1998).
- Mei, R., Galipeau, P.C., Prass, C., Berno, A. Ghandour, G., Patil, N., Wolff, R.K., Chee, M.S., Reid, B.J., and Lockhart D.J.: Genome-wide detection of allelic imbalance using human SNPs and high-density DNA arrays. *Genome Research* 10:1126-1137 (2000).
- Meksem, K., Zobrist, K., Ruben, E., Hyten, D., Quanzhou, T., Zhang, H. B. and Lightfoot, D. A.: Two large-insert soybean genomic libraries constructed in a binary vector: applications in chromosome walking and genome wide physical mapping. *Theor. Appl. Genet.* 101, 747-755 (2000).
- Michelmore, R.W., and Meyers, B.C.: Clusters of Resistance Genes in Plants Evolve by Divergent Selection and a Birth-and-Death Process. *Genome Research* 8:1113-1130 (1998).
- Milbourne D, Meyer RC, Collins AJ, Ramsay LD, Gebhardt C, Waugh R.: Isolation, characterisation and mapping of simple sequence repeat loci in potato. *Mol Gen Genet* 259: 233-45 (1998).
- Mindrinos, M., Katagiri, F., Guo-Liang, Y. and Ausubel, F. M.: The *A. thaliana* Disease Resistance Gene *RPS2* Encodes a Protein Containing a Nucleotide-Binding Site and Leucine-Rich Repeats. *Cell* 78, 1089-1099 (1994).
- Mir, K.U., and Soutern, E.M.: Determining the influence of sturdure on hybridization using oligonucleotide arrays. *Nature Biotechnol.* 17: 788-792 (1999).
- Müller, K.O.: Über den augenblicklichen Stand unserer Kenntnisse zur biologischen Spezialisierung des Krauffäuleerregers der Kartoffel (*Phytophthora infestans*). *Züchter* 7:5.12 (1935).
- Naess, S.K., Bradeen, J.M., Wielgus, S.M., Haberlach, G.T., MacGrat, J.M., et al.: Resistance to late blight in *Solanum bulbocastanum* is mapped to chromosome 8. *Theor. Appl. Genet.* 101:697-704 (2000).
- Nei, M., and Li, W.: Mathematical model for studying gene variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:5269-5273 (1979).
- Newton, C.R., A. Graham, L.E. Heptinstall, S.J. Powell, C. Summers, N. Kalsheker, J.C. Smith and A.F. Markham.: Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucl. Acids Res.* 17:2503-2516 (1989).
- Nickerson, D.A., R. Kaiser, S. Lappin, J. Stewart, L. Hood and U. Landegren.: Automated DNA diagnostics using an ELISA-based oligonucleotide ligation assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:8923-8927 (1990).
- Nordstrom, T., M. Ronaghi, L. Forsberg, U. de Faire, R. Morgenstern and P. Nyren.: Direct analysis of single-nucleotide polymorphism on double-stranded DNA by pyrosequencing. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 31:107-112 (2000).
- Nyren, P. and A. Lundin.: Enzymatic method for continuous monitoring of inorganic pyrophosphatase synthesis. *Anal. Biochem.* 151:504-509 (1985).
- Oefner, P.J. and Underhill, P.A.: Detection of nucleic acid heteroduplex molecules by denaturing high-performance liquid chromatography and methods for comparative sequencing. *US Patent* 5, 795, 976 (1998).

- Oefner, P.J.: Allelic discrimination by denaturing high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* 739:345-355 (2000).
- Oberhagemann, P.: Genetische Analyse der Resistenz gegen *Phytophthora infestans* in der Kartoffel. Doktorarbeit an der Universität zu Köln (1997).
- Oberhagemann P., Chatot-Balandras C., Bonnel E., Schäfer-Pregl R., Wegener D., Palomino C., Salamini F., Gebhardt C.: A genetic analysis of quantitative resistance to late blight in potato: Towards marker assisted selection. *Mol Breeding* 5: 399-415. (1999)
- Osborn, A. E.: Preformed Antimicrobial Compounds and Plant Defense against Fungal Attack. *Plant Cell* 8, 1821-1831 (1996).
- Parniske M, Hammond-Kosack KE, Golstein C, Thomas CM, Jones DA, Harrison K, Wulff BBH, Jones JDG.: Novel disease resistance specificities result from sequence exchange between tandemly repeated genes at the Cf-4/9 locus of tomato. *Cell* 91: 821-32 (1997).
- Parniske, M., and Jones, J.D.G.: Recombination between diverged clusters of the tomato Cf-9 plant disease resistance gene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:5850-5855 (1999).
- Pastinen, T. Kurg, A., Metspalu, A., Peltonen, L., Syvänen, A.C.: Minisequencing: a specific tool for DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide arrays. *Genome Res* 7:606-614 (1997).
- Paterson, A.H., Lander, E.S., Hewitt, J.D., Peterson, S., Lincoln, S.E., Tanksley, S.D.: Resolution of quantitative traits into Mendelian factors by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphisms. *Nature* 335: 721-726 (1988).
- Person, C., Samborski, D. J. and Rohringer, R.: The gene-for-gene concept. *Nature* 194, 561-562 (1962).
- Pfieger S., Lefebvre V. and Causse M.: The candidate gene approach in plant genetics: a review *Mol Breeding* 7:275-291 (2001).
- Powell W, Uhrig H.: Anther culture of *Solanum* genotypes. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 11: 13-24 (1987).
- Putz, B.: Wichtigste Krankheiten und Schädlinge der Kartoffel. In: Kartoffeln, Züchtung, Anbau und Verwertung, Behr's Verlag, Hamburg, 117-132 (1989).
- Radtke, W und Rieckmann, W.: Krankheiten und Schädlinge der Kartoffel. Verlag Th. Mann, Gelsenkirchen-Buer (1990).
- Risch, N.J.: Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature* 405:847-56 (2000).
- Ristaino J., Groves C. and Parra G.: PCR amplification of the Irish potato famine pathogen from historic specimens. *Nature* 411:965-697 (2001).
- Ritter E, Debener T, Barone A, Salamini F, Gebhardt C: RFLP mapping on potato chromosomes of two genes controlling extreme resistance to potato virus X (PVX). *Mol Gen Genet* 227: 81-85. (1991).
- Premstaller, A., Oberacher, H., Rickert, A., Huber, C.G., Oefner, P.J.: Multiplex analysis of single-nucleotide extension products on a 16-capillary denaturing high-performance liquid chromatography array. *Genomics*, in press (2002).
- Pyror, T., Ellis, J.: The genetic complexity of fungal resistance genes in plants. *Adv. Plant Pathol.* 10:281-305 (1993).
- Rhodes, D.A., and Trowsdale, J.: Genetics and molecular genetics of the MHC. *Rev. Immunogenet.* 1(1):21-31 (1999).
- Rickert, A. M., Premstaller, A., Gebhardt, C., Oefner, P. J.: Genotyping of SNPs in a polyploid genome by pyrosequencing. *Biotechniques*, 32(3):592-593, 596-598, 600 (2002).
- Roberts, L.: Human genome research. SNP mappers confront reality and find it daunting. *Science* 287:1898-1899 (2000).
- Robertson, D.S.: A possible technique for isolating genic DNA for quantitative traits in plants. *J. Theor. Biol.* 117:1-10 (1985).
- Robertson, D.S.: Understanding the relationship between qualitative and quantitative genetics. In: Helentjaris, T., and Burr, B. (eds), Development and application of molecular markers to problems in plant genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, pp.81-87 (1989).
- Roland, P.C.: Resistance gene evolution. *Curr. Opin Plant Biol* 1:294-298 (1998).
- Ronaghi, M.: Improved performance of pyrosequencing using single-stranded DNA-binding protein. *Anal. Biochem.* 286:282-288 (2000).
- Ronaghi, M.: Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Res.* 11:3-11. (2001).
- Ronaghi, M., S. Karamohamed, B. Pettersson, M. Uhlén and P. NyrénP.: Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Anal. Biochem.* 242:84-89 (1996).
- Ronaghi, M., M. Uhlén and P. Nyrén.: A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science* 281:363-365 (1998).
- Ross, H.: Potato breeding: Problems and perspectives. Edited by Horn, W. and Röbbelen, G. *J. Plant. Breed. Suppl.* 13 (1986).
- Ross, P., Hall, L., Smirnov, Haff, L.: High level multiplex genotyping by MALDI-TOF mass spectrometry. *Nat Biotechnol* 16:1347-1351 (1998).
- Saiki, R.K., C.A. Chang, C.H. Levenson, T.C. Warren, C.D. Boehm, H.H. Kazazian and H.A. Erlich.: Diagnosis of sickle cell anemia and beta-thalassaemia with enzymatically amplified DNA and nonradioactive allele-specific oligonucleotide probes. *N. Engl. J. Med.* 319:537-541 (1988).
- Saiki, R.K., Gelfrand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.G., and Ehrlich, H.A.: Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491 (1988).
- Salmeron, J. M., Barker, S. J., Carlund, F. M., Mehta, A. Y. and Staskawicz, B. J.: Tomato mutants altered in bacterial disease resistance provide evidence for a new locus controlling pathogen recognition. *Plant Cell* 6, 511-520 (1994).
- Salmeron, J. M., Oldroyd, G. E. D., Rommens, C. M. T., Scofield, S. R., Kim, H.-C., Lavelle, D. T., Dahlbeck, D. and Staskawicz, B. J.: Tomato *Pto* is a Member of the Leucine-Rich Repeat Class of Plant Disease Resistance Genes and Lies embedded within the *Pto* Kinase Gene Cluster. *Cell* 86, 123-133 (1996).
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T.: Molecular cloning: A laboratory Manual, 2nd ed., Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY (1989).
- Sambrook, J. and Russell, D. W.: Molecular cloning: A laboratory Manual, 3rd ed., Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY (2000).
- Sandbrink JM, Colon LT, Wolters PJCC, Stiekema WJ.: Two related genotypes of *Solanum microdontum* carry different segregating alleles for field resistance to *Phytophthora infestans*. *Mol Breed* 6: 215-25. (2000).
- Saraste, M., Sibbald, P. R. and Wittinghofer, A.: The P-loop – a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem. Sci.* 15, 430-434 (1990).
- Sarfatti, M., Abu-Abied, M., Katan, J. and Zamir, D.: RFLP mapping of *It*, a new locus in tomato conferring resistance against *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* race 1. *Theor. Appl. Genet.* 82, 22-26 (1991).
- Sauer, K.P., and Mueller, J.K.: Fernstudium, Naturwissenschaften Evolution der Pflanzen- und Tierwelt, 2. Ursachen und Mechanismen der Evolution. Deutsches Institut für Fernstudium an der Universität Tübingen (1987).
- Sauer, S., Lechner, D., Berlin, K., Plaçon, C., Heuermann, A., Lehrach, H., and Gut, I.G.: Full flexibility genotyping of single nucleotide polymorphisms by the GOOD assay. *Nucleic Acids Res (methods online)* 28:e100 (2000).
- Sax, K.: The association of size differences with seed-coat pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. *Genetics* 8:552-560 (1923).
- Schäfer-Pregl R, Ritter E, Concilio L, Hesselbach J, Lovatti L, Walkemeier B, Thelen H, Salamini F, Gebhardt C: Analysis of quantitative trait loci (QTL) and quantitative trait alleles (QTA) for potato tuber yield and starch content. *Theor Appl Genet* 97: 834-846. (1998).
- Scheffer, R. P.: Pathogens Overtake Movement of Crop Plants. In: The Nature of Disease in Plants. Edited by Scheffer, R. P., Cambridge University Press, 124-143 (1997).
- Schlösser, E.: Preformed structural and chemical barriers. In: Resistance of Crop Plants against Fungi. Edited by Hartleb, H., Heitefuss, R. and Hoppe, H.-H., Gustav Fischer Verlag, 84-99 (1997).
- Schneider, K., Bochar, D.C., Schäfer-Pregl, R., Nagl, N., Glass, C., Jeppsson, A., Gebhardt, C., and Salamini: PCR-based cloning and segregation analysis of functional gene homologues in *Beta vulgaris*. *Mol Gen Genet* 262(3):515-24 (1999).
- Schopfer, C., Nasrallah, M. and Nasrallah, J.: The male determinant of self-incompatibility in *Brassica*. *Science* 286, 1697-1700 (1999).
- Schweizer, P. und Métraux, J. P.: Pilz-, Bakterien- und Virusbefall. In: Stress bei Pflanzen. Hrsg.: Brunold, C., Rügsegger, A. und Brändle, R., Verlag Paul Haupt, 325-343 (1996).
- Simons, G., Groenendijk, J., Wijbrandi, J., Reijans, M., Groenen, J., Diergaarde, P., Van der Lee, T., Bleeker, M., Onstenk, J., de Both M., Haring, M., Mes, J., Cornelissen, B., Zabeau, M. and Vos, P.: Dissection of the *Fusarium* 12 Gene Cluster in Tomato Reveals Six Homologs and One Active Gene Copy. *Plant Cell* 10, 1055-1068 (1998).
- Sitte, P., Ziegler, H., Ehrendorfer, F. and Bresinsky, A.: Strasburger - Lehrbuch der Botanik für Hochschulen, 34., neu bearb. Aufl., Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, Lübeck (1998).
- Shen, K.A., Meyers, B.C., Islam-Faridi, M.N., Chin, D.B., Stelly, D.M., and Michelmore, R.W.: Resistance gene candidates identified by PCR with degenerate oligonucleotide primers map to clusters of resistance genes in lettuce. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11:815-823 (1998).
- Shi, M.M.: Enabling large-scale pharmacogenetic studies by high-throughput mutation detection and genotyping technologies. *Clin. Chem.* 47:164-172 (2001).
- Shumaker, J.M., Metspalu, A., Caskey, C.T.: Mutation detection by solid phase primer extension. *Hum Mutat* 7:346-354 (1996).
- Somssich, I. E. and Hahlbrock, K.: Pathogen defense in plants – a paradigm of biological complexity. *Trends Plant Sci.* 3, 87-90 (1998).

- Staskawicz, B.J., Ausubel, F.M., Baker, B.J., Ellis, J.G., and Jones, J.D.G.: Molecular genetics of plant disease resistance. *Science* 268: 661-667 (1995).
- Steinmetz, L.M., Mindrinos, M., and Oefner, P.J.: Combining genome sequences and new technologies for dissecting the genetics of complex phenotypes. *Trends in Plant Science*, 5(9): 397-401 (2000).
- Southey, J. F.: Potato Root Eelworm. In: *Plant Nematology*, 2<sup>nd</sup> edition. Edited by Southey J. F.: Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Her Majesty's Stationery Office, Technical Bulletin 7, 171-188 (1965).
- Sunyaev, S.R., Lathe, W.C., Ramesky, V.E., and Bork, P.: SNP-frequencies in human genes – an excess of rare alleles and differing modes of selection. *Trends in Genetics* 16(8):335-337 (2000).
- Syvänen, A.C., Sajantila, A., Lukka, M.: Identification of individuals by analysis of biallelic DNA markers, using PCR and solid-phase minisequencing method. *Clin Chim Acta* 226:225-236 (1993).
- Syvänen, A.C.: Accessing genetic variation: Genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nature* 2: 931-939 (2001).
- Takken, F. L. W. and Joosten, M. H. A. J.: Plant resistance genes: their structure, function and evolution. *Europ. J. Plant Pathol.* 106: 699-713 (2000).
- Tanksley SD, Ganai MW, Prince JP, de Vicente MC, Bonierbale MW, Broun P, Fulton TM, Giovannoni JJ, Grandillo S, Martin GB, Messeguer R, Miller JC, Miller L, Paterson AH, Pineda O, Röder MS, Wing RA, Wu W, Young ND.: High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics* 132: 1141-60 (1992).
- Tanksley, S.D.: Mapping Polygenes. *Annu Rev Genet.* 27:205-33 (1993).
- Tang, X., Xie, M., Kim, Y. J., Zhou, J., Klessig, D. F. and Martin, G. B.: Overexpression of *Pto* Activates Defense Responses and Confers Broad Resistance. *Plant Cell* 11, 15-29 (1999).
- Templeton, A.R.: A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping or DNA sequencing. V. Analysis of case/control sampling designs: Alzheimer's disease and the apoprotein E locus. *Genetics* 140: 403-409 (1995).
- The Arabidopsis Genome Initiative: Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408, 796-815 (2000).
- Thornberry, J.M., Goodman, M.M., Doebley, J., Kresovich, S., Nielsen, D., and Buckler, E.S.: *Dwarf8* polymorphisms associate with variation in flowering time. *Nature Genetics* 28:286-289 (2001).
- Toxopeus, H.J.: Some notes on the relationship between field resistance to *Phytophthora infestans* in leaves and tubers and riping time in *Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*. *Euphytica* 7:712-722 (1958).
- Trognitz, F., Manosalva, P., Gysin, R., Ninio-Lui, D., Simon, R., del Herrera, M.R., Trognitz, B., Ghislain, M., and Nelson, R.: Plant defense genes associated with quantitative resistance to potato late blight in *Solanum phureja* x dihaploid *S. tuberosum* hybrids. *Mol Plant Microbe Interact* 15(6):587-97 (2002).
- Tyagi, S., D.P. Bratu and F.R. Kramer.: Multicolor molecular beacons for allele discrimination. *Nat. Biotechnol.* 16:49-53. (1998).
- Van der Vossen, E. A. G., Rouppe van der Voort, J. N. A. M., Kanyuka, K., Bendahmane, A., Sandbrink, H., Baulcombe, D. C., Bakker, J., Stiekema, W. J. and Klein-Lankhorst, R. M.: Homologues of a single resistance-gene cluster in potato confer resistance to distinct pathogens: a virus and a nematode. *Plant Journal* 23(5), 567-576 (2000).
- Van Eck HJ, Rouppe van der Voort J, Draaistra J, van Zandvoort P, van Enkevort E, Segers B, Peleman J, Jacobsen E, Helder J, Bakker J.: The inheritance and chromosomal localization of AFLP markers in a non-inbred potato offspring. *Mol Breed* 1: 397-410 (1995).
- Van der Voort, J.R., Lindemann, W., Folkertsma, R., Hutten, T. Overmars, H., van der Vossen, E., Jacobsen, E., Bakker, J.: A QTL for a broad spectrum resistance to the cysteine nematode species (*Globodera* spp) maps to a resistance gene cluster in potato. *Theor Appl Genet* 96: 654-661 (1998).
- Wang, D.G., J.B. Fan, C.J. Siao, A. Berno, P. Young, R. Sapolsky, G. Ghandour, N. Perkins, E. Winchester, J. Spencer, L. Kruglyak, L. Stein, L. Hsie, T. Topaloglou, E. Hubbell, E. Robinson, M. Mittmann, M.S. Morris, N. Shen, D. Kilburn, J. Rioux, C. Nusbaum, S. Rozen, T.J. Hudson, R. Lipshutz, M. Chee and E.S. Lander.: Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science* 280:1077-1082 (1998).
- Wastie, R.L.: Breeding for resistance. In: Ingram, D.S. and Williams, O.H.: *P. infestans*, the cause of late blight in potato. *Advances in plant pathology* 7:193-223, Academic Press, New York and London (1991).
- Whitham, S., Dinesh-Kumar, S. P., Choi, D., Hehl, R., Corr, C. und Baker, B.: The Product of the Tobacco Mosaic Virus Resistance Gene *N*: Similarity to Toll and the Interleukin-1 Receptor. *Cell* 78, 1101-1115 (1994).
- Wollenweber, H. W.: Krankheiten und Beschädigungen der Kartoffel. *Arb. FroschInst. Kartoff.*, Berl. 7, 1-56 (1923).
- Woo, H. R., Chung, K. M., Park, J.-H., Oh, S. A., Ahn, T., Hong, S. H., Jang, S. K. and Nam, H. G.: ORE9, an F-Box Protein That Regulates Leaf Senescence in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13, 1779-1790 (2001).
- Wu, S.S., W. R., Ma, C.X., Zeng, Z.B., Yang, M.C.K., and Casella, G.: A Multivalent Pairing Model of Linkage Analysis in Autotetraploids. *Genetics* 159: 1229-1350 (2001).
- Xiao, W., D. Stern, M. Jain, C.G. Huber and P.J. Oefner.: Multiplex capillary denaturing high-performance liquid chromatography with laser-induced fluorescence detection. *BioTechniques* 30:1332-1338 (2001).
- Young, N.D.: QTL-mapping and quantitative disease resistance in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34:479-501 (1996).
- Young, N.D.: A cautiously optimistic vision for marker-assisted breeding. *Molecular Breeding* 5. 505-510 (1999).
- Young, N.D.: The genetic architecture of resistance. *Curr. Opin. Plant Biol* 3(4):285-90 (2000).
- Zhao, L.P., Aragaki, C., Hsu, L., Quiaoit, F.: Mapping of complex traits by single-nucleotide polymorphisms. *Am.J.Hum.Genet.* 63:225-240 (1998).
- Zimnoch-Guzowska E, Marczewski W, Lebecka R, Flis B, Schäfer-Pregl R, Salamini F, Gebhardt C: QTL analysis of new sources of resistance to *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* in potato done by AFLP, RFLP and resistance-gene-like markers. *Crop Science* 40: 1156-1167. (2000).

## 8. Abkürzungsverzeichnis

al.	alli
A	Adenin
ASO	<i>Allele Specific Oligonucleotide</i>
AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	<i>Bacterial Artificial Chromosome</i>
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CAPS	<i>Cleaved Amplified Polymorphic Sequence</i>
cDNA	komplementäre DNA
CG	<i>candidate gene</i>
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
DFLP	<i>Different Fragment Length Polymorphism</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DFLP	<i>DNA fragment length polymorphisms</i>
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylenamintetraessigsäure
FA	Formamid
G	Guanin
Indel	Insertion/Deletion
h	Stunde(n)
kb	Kilobasenpaare
KG	Kopplungsgruppe
l	Liter
LRR	<i>Leucine-Rich Repeat</i>
M	Mol
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimol
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
MTL	<i>Mendelian Trait Locus</i>
NBS	<i>Nucleotide Binding Site</i>
pmol	pikomol
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
QTL	<i>Quantitative Trait Loci</i>
RAPD	<i>Randomly Amplified Polymorphic DNA</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RGL	<i>Resistance Gene Like</i>
RGA	<i>Resistance Gene Analogue</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SCAR	<i>Sequence Characterized Amplified Region</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SSCP	<i>Single Strand Conformational Polymorphism</i>
SSR	<i>Simple Sequence Repeat</i>
T	Thymin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>Unit</i> (Enzymaktivität)
vol	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

### ***IUB ambiguity codes:***

R	=	A	+	G				
M	=	A	+	C				
W	=	A	+	T				
Y	=	C	+	T				
S	=	C	+	G				
K	=	G	+	T				
V	=	A	+	C	+	G		
H	=	A	+	C	+	T		
D	=	A	+	G	+	T		
B	=	C	+	G	+	T		
N	=	A	+	G	+	C	+	T

## 9. Anhang

### 9.1. Oligonukleotide, Reaktionsbedingungen und Klone

**Tab. 9-1: Primer-Paare und Reaktionsbedingungen für PCR-Reaktionen.** Unter TA sind die *Annealing*-Temperaturen [°C] bei der „Standard-PCR“ angegeben bzw. es wurde die „stringente“ PCR (Str.) genutzt (Kap. 2.3.3.). Alle Primer entworfen vom Autor, außer \* = Agim Ballvora, + = Jürgen Paal, # = Jeong Hee Kim, ~ = Petra Oberhagemann, ^ = Peter Oefner.

Forward-Primer	Sequenz des Forward-Primers 5'-3'	Reverse-Primer	Sequenz des Reverse-Primers 5'-3'	TA
1 m23 t3 f	AAA GAT CCT TCT CAT CCT CTG TC	1 m23 t3 r	AAT GTG TTG TGC ACT AGT CTA CC	59
1 m23 t3 f	AAA GAT CCT TCT CAT CCT CTG TC	1 m23 t3 r a1	GTT TGA CTT AGT ACT AAT TAT GAG C	56
1 M23 map al50 F	AAC CCT CCT ATT CAA TAT C	1 M23 map R	GTG TTG TGC ACT AGT CTA CC	Str
5 g19 t3 f	CAT GAA GCT CCT CCA AGT TTT CT	5 g19 t3 r	TGC AGC AAT TTC TGT CTC TAC GA	59
5 g19 t7 F	TTA CCT CAA ATT AAA GAA AGA GGT G	5 g19 t7 R	AAG ACA CAT GCA ACA TAT ATA AAG C	56
7 a7 t7 F	AAG TTT TAT CCA TCA ATG GTG ATA G	7 a7 t7 R	GAC CCA AAT TAC AAC ACC ATG GC	56
9 n6 t3 f	GTT CAA TAG ACC CCT GAT GTC G	9 n6 t3 r	AAT CAT TCT CTC TCG ACA ATC AGG	59
9 n6 t7 F	TAG CTG TTG CTT GTT GCT ACA AC	9 n6 t7 R	GGT CTT GTA ACT AAA CTG GAA GC	59
9 i23 t7 F	GAG AAC GTC CTG CTT TGC CAA C	9 i23 t7 R	TCA AGA GTA TGG GTA TAG TAT TTG	56
12 e7 T3 f	ACT CTT AAG CAG GAG TCT TTG AG	12 e7 T3 r	TTC TGA CCA CAC TTG AAA CAA CC	56
12 e7 T3 f a1	GGG CTG TCT CGG TTG TCG AGC	12 e7 T3 r a1	GTT CCT ACC ACA TTT GGC ACA GA	56
12 e7 T7 F	TTG AAT TAC TTG AAA TCT TGA AAC G	12 e7 T7 R	ATC TTC AAA AAG AGA CAA AGT CCG	56
17 f21 t3 f	ATA ATG TCA ACG AGA CCT CCA CA	17 f21 t3 r	CTA TTG GCA AGC ATA GCA TGG A	58
17 f21 t7 F	GGA ATA GCT ACT GCA ACT ATG GA	17 f21 t7 R	ATC CGT ACA ACC AAA TTG AGG TG	59
18 b3 T3 f	TCA TGA GTT TAA CAG AGC CAA GG	18 b3 T3 r	TAA CTC AAC AGA ATA ACT CCA TGC	56
18 b3 T7 F	CTT GGA TTT CCA AGA AAT GGG TG	18 b3 T7 R	TTA TTA CAG GAG ATG ATT TGC ACG	56
18 o5 t3 f	GAA TCC GGA ATT AGA GCT TGA GA	18 o5 t3 r	GAA GTC TTG TGG TTG TGT TGA AG	59
18 o5 t3 f2	AAA TGC AAA TCT GCA CAG ACA GG	18 o5 t3 r2	CAT GAT TTC GGA AAT TCG ACT TC	56
18 o5 t7 F	ACC TGC TGA GCA TGA ATT ATG AG	18 o5 t7 R	CAA CCA GAA CAA TTA GCA GGT TC	59
30 p15 t3 f	TCG ACA CAT CTA GAA TAA CCA AAC	30 p15 t3 r	AAC TCT ACT ACC TTG CCT AAA TC	59
30 p15 t7 F	ACA ACA ATC TCA TGG TGC TCA TG	30 p15 t7 R	AGT GTG GCA TTA TGT AAT GAC AGA	59
31 n11 t3 f	ATT ACA TGC TCG TAC ATT CCA CG	31 n11 t3 r	ATG CTT GTA AGC TTG TGA GTA ACA	56
31 n11 t7 F	GAG TAT GTC ACT TGG TAG ATT TGA	31 n11 t7 R	TTT GGT GAG CTT TCA TCA TGT AAG	56
32 d22 T3 f	CCT AAG CCT AAA CCC TGA ATC C	32 d22 T3 r	TGG ATT CTG GGA TTA GGT CTT AG	56
32 d22 T7 F	ATA TCC CTA ACT TAG GTT GCG AC	32 d22 T7 R	TTG GAG CAT ACA TTA TTC TAT CAT C	56
32 d22 T7 Fa1	TCC AAA GGG TTG TGA CTT CTC GA	32 d22 T7 Ra1	TTC CTC AAG TAC TCG AGG TTA TGA	56
34 j14 t7 F	AAA AGT TGA GCC CAT TCG AGT GA	34 j14 t7 R	GAG TTT CTC ATA CAA ACC TCC TC	56
34 j14 t7 F a1	GAG AAG AGT TGA AGA GGA TAA AG	34 j14 t7 R a1	ACT CTT ACC AAA GAT TCA CAA CAC	56
34 j23 t3 f	TTC AGC ACT AGC AGT TAG GAT AC	34 j23 t3 r	AGT TCA TTC AAC TTC TCC GTT CC	56
34 j23 t7 F	TTG TTT GCC AAT GCC ACC CAT G	34 j23 t7 R	TAC TTG ATG GCA GCT TAT AGT GC	56
34 j23 t7 F2	ACT ATA AGC TGC CAT CAA GTA TTC	34 j23 t7 R2	GAA GTT TGA GTG TCA TGT TTA TGT AT	56
35 h22 t3 f	TTT CTG GCA ATG ACT CAC AAG GA	35 h22 t3 r	ATG GAT TAG AGA CCA TAC AAC AAG	56
35 h22 t3 f a1	GGC AAT TAG AAT CAT GTA TGC ATA ATA	35 h22 t3 r a1	ATC TTG TTT TCC AGG GGA CCA AG	56
35 h22 t7 F	CCG CTT GTA CTT TTA GCT GTT CA	35 h22 t7 R	AAT TTC TTC ACG CCT TCC ACA CA	56
37 i12 t3 f	TAC CAT AAT CCA AAG CCA TAG CC	37 i12 t3 r	ATT GAA GGC AAA GGT CAA GTT GG	56
37 i12 t7 F	TGC TTT AGA ATT CCC CGT ACA TG	37 i12 t7 R	CAA TCG AGA ACC ATT GCT GGT C	56
37 i12 t7 F2	TGT GAG CTT AGG AAT TCA AGA CG	37 i12 t7 R2	GAA GTT TGG CCA TAA ATA TCA AGG A	56
41 b2 t3 f	CTT ATT GCT TTA CTT TGA GTC CAG	41 b2 t3 r	CAT AAC TCA ATG CAA TGC AAA GTC A	56
41 b2 t7 F	CCA TGG ATT CTT TCA TCT ATG GAG	41 b2 t7 R	TAG ACT TCA AGG CAT TCT AAT CAC A	56
42 p4 t3 f	ACC TCA GAG GTT GGT TGT ATA AG	42 p4 t3 r	GCA GAG AAT GTC CTC GCA ATA	59
42 p4 t7 F	TCA CAC TCG TTT GAC ACG TAA AC	42 p4 t7 R	CAG ACT ATC ATC AGC TTA GAG TC	56
44 a10 t7 F	ATA TTC CTC CGG AAA CCT TTT CC	44 a10 t7 R	ATG GGA ATA GGT CAT GTT CGA TG	56
44 a10 T7_Fa1	CTA CAT CAC CTG CAG CAC TCC	44 a10 T7_Ra1	TTT CAT GGA AGC TGG ACG GCT AG	56
44 a10 t7 F2	TAT CTA ATG ATC AAT CCA ACC GCA	44 a10 t7 R2	GTA TCG ATC TTG AGA GCT TGA TGA	56
44 a10 t7 F2a1	CTA CAT CAC CTG CAG CAC TCC	44 a10 t7 R2a1	ATC ATC AGT TTT GGA ACA AGG TAA CA	56

Fortsetzung Tab. 9-1: Primer-Paare und Reaktionsbedingungen für PCR-Reaktionen.

Forward-Primer	Sequenz des Forward-Primers 5'-3'	Reverse-Primer	Sequenz des Reverse-Primers 5'-3'	TA
46 d8 t3 f	CTC TTT TGA TTA TGT TAA GGA GGG	46 d8 t3 r	ATT GAG AAA TTG AAT GAA CTA GGA G	56
46 d8 t7 F	TTG GGT TCA ATA CTA CTT AAC CAC	46 d8 t7 R	TTA CAA AAT ATA TAT ATA TTA ATG CTA TG	56
47 b18 t3 f	AAG GTC ATG ATT CCT TCT CCT TG	47 b18 t3 r	CAT TCT TAC ATA AGT GCT CTA TGC	56
47 b18 t7 F	TTT TCC AAG AGT CTT CAT TGA ACG	47 b18 t7 R	CCC AAA AAT GTA CTG GCT CTT ATG	56
47 f2 t3 A*	ACA ACA CGA CGA TTT CT ATC AG	47 f2 t3 B*	TTC AAG ATG GTC ATG TGA TGA GG	58
47-F2-T3-Aa_bio	GTG TTT GGG TTA CAA TAT CTC AAG	47-F2-T3-Ba	CCC TAG TAG TCA ATA AAA TTC GAC	56
47 f2 t7 C*	TAA CCA ACA TTA TCT TCT TTG CC	47 f2 t7 D*	ACT GAA TTT GGA GAG GGG TTT GCT G	56
48 o12 t3 f	TAG CGT GTA CCG TGT TAA CTT TG	48 o12 t3 r	TGA AGC TTT TAG TGT TGA AAC TCC	56
48 o12 t7 F	GTA TAT TGC TTT ACA GGT CAC GG	48 o12 t7 R	AAT GTG CTC AAC ATT GTC ACT GC	56
51 k12 T3 f	GTA ATA ATT ACT GGC AGA TGA ACC	51 k12 T3 r	TGA GAT CTT CGC AAC TAA TAA CTC	56
51 k12 T7 F	GCC CCT ATT GTA GCA AAC ATA G	51 k12 T7 R	GAT GTA GAT GCA AAG AAG AGA AG	56
51 k12 T7 F a1	ATT AAG GAG TTC AAG TAA TAA ACA TGG	51 k12 T7 R a1	AAA CTC CTT AAA ATG TAA GAT TTG TA	56
52 i9 t3 f	ACT AAA ATG GTT TAT ACC TTT TAA GG	52 i9 t3 r	ACT CTT GAA CTG TGG AGC AAG G	55
52 i9 t7 F	GAT CTG TGT GTC TGA ACC ATA TG	52 i9 t7 R	CAA ATA TAG AGT GAA AAG ATT ATG AG	55
54 n6 t3 f	AGA ACT ATA TGT GTT ATG AAT CAC C	54 n6 t3 r	ATA AGT TTT CAT AAC CAC ACG ACC	56
54 n6 t3 fa1	ACC ACG TTC GGG TAT GCT AAC AG	54 n6 t3 ra1	TCA TAA CCA CAC GAC CAC TCC GA	56
54 n6 t7 F	CTA GCA ACC AGA GTA GAC AAA AG	54 n6 t7 R	TGA TTT CCC AAG ATG CTT TTC AAC	59
62 l7 t3 f	GTG CTA ATA TCG TAA GAA GTG GC	62 l7 t3 r	ACA GAT TCA GGT GAT GCA CGT G	59
62 l7 t3_fa1	TCC AAC TTC AAG GAT GGA ACA AG	62 l7 t3_r	ACA GAT TCA GGT GAT GCA CGT G	56
62 l7 t7 F	GGC TAT CAT CAC AAA TAA GAA AAA G	62 l7 t7 R	TCA TCA TCT TTT CAC TCA TTA TTT G	55
62 l7 t7 F2	AAA TAA TGA GTG AAA AGA TGA TGA GA	62 l7 t7 R2	CAA GTT TGG TGT ATT GAA CTT GTT C	56
63 o3 t3 f	AGA TAT TTC TCC AAC CAG TAC GG	63 o3 t3 r	TCT ATC TGC AAC AAT GAG ATC CG	59
63 o3 t7 F	AGA CTC ATA TGA GTG ATT TTG GAG	63 o3 t7 R	TGT TGA GTT GGT TGC CTG TAA C	58
65 f5 t3 f	AGA TGC TTC TAA AGG TAC CAA CC	65 f5 t3 r	ATC ATC ATA ATC TGA TTC GGA ACC	56
66 k2 t3 f	AAA GCT AAT ATA GGC TCC CAA GC	66 k2 t3 r	GAG TAT ATA ACA AGA GAG CTC GG	59
66 k2 t3 f a1	CTT CAT TCA TAC TAT ATG TTC AAT GG	66 k2 t3 r a1	TTC AAT CCG AGC TCT TGG AAT TG	56
66 k2 t7 F	TAC ACA TTT TGA ATT ACT CCT GGG	66 k2 t7 R	ATG TTG TCA TGG TAA TTG TCA GTC	58
66 k2 t7 Fa1	CCC TTA GGA GGG TAC TTC CTG AAC	66 k2 t7 Ra1	ACG TTC CCC AAG GGC GAA CGT TA	56
67 n2 t3 f	GGC TAG GAC TGG AAA CTA TGA C	67 n2 t3 r	TGG ACT GCT ATA TAA GGC GTT AC	59
67 n2 t7 F	TAG ACG TGA CAT GGC GAA TGA G	67 n2 t7 R	CTT CAC TTT GAT CAT GCA TCC TC	59
70 b11 t3 f	AAT ACT AGC AAA AGT ATT CCA CAA C	70 b11 t3 r	GTT CCC TTC AAA TTT TCT TTC TTT C	56
70 b11 t7 F	ATT CTT GAG ATA TTG TAA CCC AAA C	70 b11 t7 R	TTT GAG GAA CAT ATT AGA CTT GTT G	56
70 b11 T7_Fa1	CAC TCA TAG AAG AAG CGC CAA TC	70 b11 T7_R	AGT GAG GCA GAG GAT GTT GTT G	56
71 g1 t3 f	GCA TGA TAG CTT ATT CAT CCA TG	71 g1 t3 r	CTG GCT TCG GCA ATA GTT ATT GA	56
71 g1 t7 F	CAC AAT CAT CTG ACC ATC GAA AC	71 g1 t7 R	CTA GGT TGT GTA ATG ATG TAG CGA	56
73 e8 T3 f	TGG CCT GAA TTT GGA TCA AAT GG	73 e8 T3 r	AGG GCC TTC TTG GTT AAT ATC AC	56
73 e8 T3 f a1	AGA CCA AAT AAA GGT ATA TGA AGA TC	73 e8 T3 r a1	GTT AAT ATC ACT CAT GGC ACT ATG	56
73 e8 T7 F	GTT CCA TTT GCA ATT GTG GAT ATG	73 e8 T7 R	AGT TAA TGA ACT CCT AAA GGG ATC	56
73 e8 T7 F a1	GAA AAA CTT GTT TGA TTA TTA TGT TA	73 e8 T7 R a1	TTT CCA CCA CAT TAA TAT ATC AAA TTC	56
76 o11 t3 C *	CAG GAC ATC AAT ATA AAT ACT GTT GC	76 o11 t3 D *	CGT ACG TAT GAG GAG TCT GTA TC	59
76 o11 t3 ca1	CTA TTT GTT CCT TCA TGT GTC CTG GA	76 o11 t3 D *	CGT ACG TAT GAG GAG TCT GTA TC	56
76 o11 t7 A *	GAA GTC CAC CAT ACC ACA AGC A	76 o11 t7 B *	GAG GAA ACG CAG TGA ATC TGA	55
76 o11 t7 A *	GAA GTC CAC CAT ACC ACA AGC A	76 011 T7 Ba1	AGA AAA TCG ACA TAG CCT AGT CC	56
81 l15 t3 f	CCA CTT CCT TGT GTT TTC ATG AC	81 l15 t3 r	ATT GAA TCC TGT CAA GCC AAC AC	59
81 l15 t3 f a1	CTG TTG GGT CTT CCT ATA AGT TGG	81 l15 t3 r a1	TGA AAC CAC TAA ACA TGA CAT TTT G	56
81 l15 t3 f2	TGA ACT GAA GTA TGA TGT TCT TGC	81 l15 t3 r2	TCA CAA GAT TTG AAC TTG TGA TGA GT	56
81 l15 t7 F	AAA TGC CTG ACT CAC ATT TGC AG	81 l15 t7 R	TCA CAT CAA ATA TAG CCT AAT ATG G	59
87 d17 t3 C *	GTA GTA CAT CAA CAT ACA TTT TGC GG	87 d17 t3 D *	CTC AGA ATT CAG AGC TTC AAC TGA TG	58
87 d17 T3_Ca1	AAC AGG CTT AAT CCT CAT CCG C	87 d17 T3_Da1	CTG TTC TCG CGA AAT ACA GGA G	56
87 T3 Ca2	CCA CTC TTT TCG AGC GAA GGC	87 T3 D *	CTC AGA ATT CAG AGC TTC AAC TGA TG	56
87 d17 t7 A *	TAT TGG ACT TCA TCG ACT TGT AT	87 d17 t7 B *	CAG CTA TGT GAT GAT TGT TGG AGA TTC C	58
87 d17 t7 Fa1	ATA TCA ACG TGG GAG TTG TGG GA	87 d17 t7 Ra1	TAT CAT GAT GGC TGA GTC AAG AAG	56
88 b3 t3 fa1	GTT GAT GAT GCT GGT ATC TTT GGA	88 b3 t3 ra1	CAG ACC AAA ATG TTT CTG CAC TC	56
88 b3 t7 C *	CAA ACT AAC GCA GAA AAT TCA AGC	88 b3 t7 D *	TGG TTC TGT AAA TTT TGA GAA GTT G	59

Fortsetzung Tab. 9-1: Primer-Paare und Reaktionsbedingungen für PCR-Reaktionen.

Forward-Primer	Sequenz des Forward-Primers 5'-3'	Reverse-Primer	Sequenz des Reverse-Primers 5'-3'	TA
88 b3 t7 C a1	CTT CAG GAT ACA AGC TTT CAA TCT G	88 b3 t7 D a1	ATT TTG AGA AGT TGA ACA TCC CTC A	56
106 c14 t3 f +	GAC AAA ACT AGA ATA ATT TAG TAG CTC TAC	106 c14 t3 r +	CGC TAC TTA ACA TAC TAT GTA TC	56
106 c14 t7 F +	CTC TCA GTT CCT CCT CCG CGT GCA A	106 c14 t7 R +	GTA CAT TGT TAG CTG CTG AAT CAT GTT ACC	56
106 h21 t3 f	CTT CCA ATC GAG GAA ATA AGG TC	106 h21 t3 r	GTT TGG TAA GAA GTT GAC ACA TTG	58
106 h21 t3 fa1	GTA TAG CTC AGT CAG ATT GGG ACA	106 h21 t3 ra1	TGT GCT CTA TAA ATT GTT CTC TGT GA	60
106 h21 t7 F	CAA TGC TCG AGG AGA TAC ATG C	106 h21 t7 R	CAC TCC CAG TGA TGA CAA TGT C	60
106 h21 t3 fa2	TAG CTC AGT CAG ATT GGG AC	106_In141_al38r	CCT TTT TTT TTA TGT ATA TAT G	Str
106_SNP83_al50_f	TAG GTC ATA CGT GGA GAA GCT	106 h21 t3 ra2	GCT CTA TAA ATT GTT CTC TGT GA	Str
106 I5 t3 f	AGG TAA GAG TTC CTT TGT ACT CC	106 I5 t3 r	GGA AAC CTA ACT CAA CAG AAT AAC	59
106 I5 t3 fa1	CCA TCT CAG TGT TAT ATA GGC TTC A	106 I5 t3 ra1	ATA AAA CAA CCT AAC TGA TGC ATA ACA	56
106 I5 t7 F	GAG AAA GCT CAG AAG CTC TTT TG	106 I5 t7 R	AAG CAA GAT TTC GTC AAG GAT CG	59
109 b4 t3 f	GCT AGA ATA TAG TAT GGC CTT CC	109 b4 t3 r	TTG GGA AAC ACT TGG TGC TGG A	59
109 b4 t7 F	GAG CAA CAT GAT GGA AAC ATT TGA	109 b4 t7 R	CAC TGA TCT TAC TTT CAC TAT GTG	58
113 a17 t3 f	TTA CAA GTG AAA TGC TAC GAC TTG	113 a17 t3 r	GCC TGA GAT TTC AGT TTC TAT CC	59
113 a17 t3 f a1	CTT TCA CTG CTC AAT GAT TTG CAG	113 a17 t3 r a1	TGC AAT GAG TAT TTG TCT TTG CAG A	56
113 a17 t3 f a2	GAA AGA GTG GTC AGA TTC CAA GC	113 a17 t3 r a2	TGC AAT GAG TAT TTG TCT TTG	56
113 a17 t7 F	ATG GGA TAG TGA TGA CCA GTT TC	113 a17 t7 R	ATG CTT GGT CAA CAT GAC GAA AC	59
113 a17 t7 Fa1	CAA TGC ATT ATC CGA GAT CGA CA	113 a17 t7 Ra1	TCG AGG TGT ATG TAG ATG ATG TCA	56
113 m7 t3 f	TGG GGA AAT AAG GTC ATG ATT CC	113 m7 t3 r	ATG GTA TTT ATA TGG GAT GTT TCT C	56
113 m7 t3 fa1	AGT AGG CAG TTG GAA GTT GGT GA	113 m7 t3 ra1	CTG TTA AAA CTA TAA TAA TTG CTT TAT A	56
113 m7 t7 F	GCT TAT ATA TAT GAC TTT TCT TCA TTA	113 m7 t7 R	GTT CAT GGT TTG TAT ATG CGT TTC	56
114 i24 t3 f	AGA TCT GTG GAT GTA TAG GCGT AG	114 i24 t3 r	CTA ACA CAA TGT ACT TGC AGG TG	59
114 I24 T3_fa1	CTT TGG CTT TTG AAC AAA GCA AAC	114 I24 T3_r	CTA ACA CAA TGT ACT TGC AGG TG	56
114 i24 t7 F	GAA GTG CTC ACC AGA AAC CAA G	114 i24 t7 R	TTC TGA TTT GCC CTC GAT TTG TC	59
116 j10 t3 f	GCT TTG TGA AGG ACG AAC TAC C	116 j10 t3 r	TGG GAG CCA ACT TTC TTC TAG G	60
116 j10 t7 F	TAA CTT AAC ATC TAA AAG CCT AAG C	116 j10 t7 R	TGT AAC GAA ACT AAC TTT TTG TAC C	56
117 h8 t3 f	AGT TTG TGG TAC TCA TAT GAA TGG	117 h8 t3 r	GGT AAC CTA ACA AAG CAT ATG GC	56
117 h8 t7 F	ATT TGA TGC TTG CTT ATT CTC TGC	117 h8 t7 R	TGA ATT TGG GAT TTA GTG ATG	56
121 o1 t3 A *	GCT ACA GTG CAT ATG GGC CAT GG	121 o1 t3 B *	AGA AGA CCA ACT GCT GGT ATA GC	59
121 o1 t7 C *	AGT ATT TCA AGC CGT ATT GGA A	121 o1 t7 D *	ATC CTG ACT CAT ACT CTC CTG C	59
121 o1 T7_Ca1	AAT TGT ACT AGG TAG TAA TAG CGT G	121 o1 T7_D *	ATC CTG ACT CAT ACT CTC CTG C	56
122 p13 t3 A *	AGT AGT TGA GAA TAG GAG GCC TAA C	122 p13 t3 B *	CTG CTA TCA TAA ATG ATA GGC AAG	60
122 p13 t3 Aa1	GAC TAA AGT AAG TTG TGA GAT GAT CT	122 p13 t3 Ba1	ACA GCC TAC ACA CAT ATC AAC GCA	56
122 p13 t3 Aa1	GAC TAA AGT AAG TTG TGA GAT GAT CT	122 p13 t3 Ba2	AGC AGT GCA TTA GTT GAG TCA AGA	56
122 p13 t7 C *	TCC AAT AAC TCT TTC TGA GAT ATA GG	122 p13 t7 D *	GCA TAT CAA TAT GTG CCA AAG GAG	60
122 p13 t7 Ca1	GTA TTT CAG CAG GAA CAC CAG TC	122 p13 t7 Da1	GAA ATC ATA CTT ATA AGA TGT GTA ATG C	56
129 o7 t3 A *	GGA GGC TAA GAA CAC TTC TTC TGA G	129 o7 t3 B *	GAG ATT TGA ACC TGA GAC CTC ATG	61
129 o7 t7 C *	GGA TTA AGG AGG ATA TTC GAC AG	129 o7 t7 D *	CCT CTC CCT TAT ATT CAA TCC ATG	59
129 O7 T7 C a1	GCT GAT ATA TCA GCT AAG CAG AG	129 O7 T7 D a1	TTT CTC CAG AGA AGA AAA TGA CTC	56
132 h9 t3 C *	GAA AGG CCA TGT ATA TGC AGC	132 h9 t3 D *	GCT ATC AAT ATA CTT ATC TGC TC	56
132 h9 Ca1	ACT CAG GGG ATA ATA GGA CTA GGA	132 h9 Da1	GTA ACT TCT CTT CTT GAG GTG GAC	56
132 h9 Ca1	ACT CAG GGG ATA ATA GGA CTA GGA	132 h9 Da2	GGT GTA TAA TCA GTG TAC TGA GG	56
132-h9_al40_Ca2	AGA AGA AGT TGA GGA ACT CAA A	132 h9 Da1	GTA ACT TCT CTT CTT GAG GTG GAC	Str
132 h9 t7 A *	CAT CAA TAT AAA TAC TGT TGC GGC TG	132 h9 t7 B *	CAC GGA TGT TGT AAG GGA TCG	56
157 f6 T3 f	AAT CAT GTT GTG TGT CCA AGA CC	157 f6 T3 r	TGC ATT AAG GGT GGT TAG ATA CC	56
157 f6 T7 A	TCG TTT CTA CTT TGC CAT TCT CC	157 f6 T7 B	AGA ACA AGA AAC TGA GAA GGT GG	56
157 f6 T7 A a1	GTT CAG AAT CCA CTT CTA TCC ACC	157 f6 T7 B a1	CAT TGT GCT TAG ATC CTC ATC AAG	56
168 d15 t3 f	AAA TCC CTA TAT GAA CTG TTA TAC C	168 d15 t3 r	AGG TGT AAT CTT TCA AGT AGC TTG	56
168 d15 t7 F	TTT CAT GAG GGA CTA TCA AAG CC	168 d15 t7 R	ATC CTA ACA CTC ATC ATT TCA GAC	56
202 b23 t3 f	CCA AAC CTC ATC ACG CCC TTC	202 b23 t3 r	CAT TTC AGA CCG AGG TTC ACA G	59
202 b23 t7 F	AAT TGG AAA TAG TCA TTT TTG GAA AG	202 b23 t7 R	AAA CAC AAC CAA ATC TTT TCT CGG	56
202 k7 T3 f	GAT GCA TCC ATC TAA TGG TAA GG	202 k7 T3 r	TCA CCT TGA CAT TAG CAA AGC TC	56
202 k7 T3 f a1	GAA ATT TTG TCC CTC TAT ATC CGA A	202 k7 T3 r a1	CCA CGT TTC TTC TAA GTG GTC GTA	56
202 k7 t7 F	CAT TAG GAC AAT GCA TCA CTT GG	202 k2 t7 R	AGT GAA GGG CAA AAT GGT AAT CC	59

Fortsetzung Tab. 9-1: Primer-Paare und Reaktionsbedingungen für PCR-Reaktionen.

Forward-Primer	Sequenz des Forward-Primers 5'-3'	Reverse-Primer	Sequenz des Reverse-Primers 5'-3'	TA
213 c14 t7 A *	CAA TTG ATT CAT TTT ATG TAG CGA G	213 c14 t7 B *	TCT TGA CGC AAA CCT CTG CGA G	56
213 c14 t7 A a1	GTA TAA TGA GAA CCT TAT AGG TCA TGC	213 c14 B t7 a1	GTC TCT GAC TGC CCA GGT TAG A	56
213 c14 T7_Ba1re	TCT AAC CTG GGC AGT CAG AGA C	213 c14 T7_B *	TCT TGA CGC AAA CCT CTG CGA G	56
213 c14 C t3 *	CTC AAC CTT ATA GTT TCC TGC TTG	213 c14 D t3 *	GCA AGA GGA GGC AAG AAG TAT	56
213 c14 C t3 a1	CGG TCA GGG ACA TCA TGC GCA	213 c14 D t3 a1	GTG GTA TCT GCT AGC AAT TGC TAC	56
218 o11 t3 f	TCT TCT TAG AAC TCT TGA TCA ACC	218 o11 t3 r	TGA TGC CTG ATT GGA AGA TGA TC	58
218 o11 T7 F	GAC TTC CAG AAG ATG TCC TTA TG	218 o11 T7 R	GGA TGT TTG GGA TAG CAT ATC AC	56
218 o11 T7 F a1	AAA TCA CCC ATA GAA AGA AAG CAC	218 o11 T7 R a1	TTA TTG ACT ACT AGG GAA ACT GAT G	56
219 k9 t3 f	TCT TCC CAC CTA CTG AGT TTC C	219 k9 t3 r	AAG CAG GAA ACT CAT GAA ACC AG	56
219 k9 t7 F	AGC AAG TGT TGT TTT GCC AAT GC	219 k9 t7 R	GCT GAA CTA GAT TCT CTT CAT GC	59
225 k20 T3 f	CAA GGA ATC ACA GTC TTT GCC G	225 k20 T3 R	TGC AAC ATG TGG TAG ATA GAA GG	56
225 k20 T3 f a1	CAG AAA CGG CAA CTA TTC TAT GTG A	225 k20 T3 R a1	ACC TCA CCT TCT TTA CGA CTG TTA	56
225 k20 T7 F	GAA ACC ATA ACT GGA ACT ACT CC	225 k20 T7 R	TGA TCC TAC CGA CTG AAA GTA TC	56
225 k20 T7 F a1	AAT CAC TGA TTT CCA TAC TTA GCC A	225 k20 T7 R a1	CAG TCA AGG TCC TTT GGA GGA AC	56
228 d23 t3 f	GTG ATC TGG AAT CTT TGA CAT CTG	228 d23 t3 r	AAA AGC TTT TAA TAT TTG GGC CGC	56
228 d23 t7 F	CTC TAA AGT CTA AAC TAT CTC CTC	228 d23 t7 R	GAA GTG TAG TAA TAT TTG AGC ACC	56
228 g19 t3 f	TCT GTA AGA CAT GCT TGT TGT TGA	228 g19 t3 r	CAG ACC CAT TAC TTG TTG TTT CG	58
228 g19 t7 F	GAC TGT TGA GCC AAC ATG ACT C	228 g19 t7 R	TGG AAT TAT GTT CAG CTT TGG TGA	58
228 g19 T7_F	GAC TGT TGA GCC AAC ATG ACT C	228 g19 T7 Ra1	CAT GGA ATG ATG CAT GTG GGT C	56
261 b9 t3 f	TGT CAT CTC TTT GCA GGT TTT GG	261 b9 t3 r	AGC GAG GTA ATG CAA GTG TAA AC	59
261 b9 t3 f a1	AGT TGC TGC CAG TGG TTA TTA CG	261 b9 t3 r a1	AAC TAA ACC AAG TAA CCA ATC CAA G	56
261 b9 t7 F	TCA AAA TTC ACA GGG TGA TTG GC	261 b9 t7 R	ATG AAG TTA CTC AGG CTA ACA GG	59
261 b9 t7 F	TCA AAA TTC ACA GGG TGA TTG GC	261 T7 Ra1	CAA TAA TAT CCC AGC AGA CTT GG	56
4 CL F a1	AGC TTG TTT TGC GGG GAA AGT G	4 CL R a1	AAA TGG TCC AAT TGT CAC TTT ATG C	56
4Cl Fa1	AGC TTG TTT TGC GGG GAA AGT G	4Cl R a2	TGT GCA ACG CTT GTT ACT AAT CC	56
CosA-1b 30 ~	GAA TGT TGA ATC TTT TTG TGA AGG	CosA-1b 29 ~	CTC ATT CAA AAT CAG TTT TGA TC	55
CosB-2a s2 ~	CTG GAA TCA ACA GTT AAA GGA T	CosB-2a56,75t7as~	TTG TGT ACC AAT AAA ATA AAA TAA AA	57
CP 110in2f #	TCT CAT GGC ACG AAA AGA AG	CP 110r #	TAG TAA GAG TAC ATG GAG AC	56
CP 135 F #	GAA AAC TAA GGT GGC CAG AAC	CP 135 R #	GGA AGA GTA CAT GGA TAC ATT G	56
CP135ex_Fa1	TGA GAA GGA AAA TTC ACT CAT AAG	CP135ex_Ra1	TGG AAG AAG ACA TGG ATA CAT TG	56
CP 105 F a1	GAT GTT GTA CAA GCT TGT CAA ACC	CP 105 R a1	CAA AAT CAG GCC ATT GTG AAT GAG	56
CP 44 F a1	GGT GGG ACC TGA GAA GAC AAG C	CP 44 R a1	ATT ACC AGA TGC AGA GAT GCT CA	56
GP 179 F	GGT TTT AGT GAT TGT GCT GC	GP 179 R	AAT TTC AGA CGA GTA GGC ACT	56
GP 205 F a1	GTA TAT GAA AAC TGC CTA AGC TAG	GP 205 R a1	GCT TCA ATG ATC TGT TTA AAT ATT CC	56
GP 23 F a1	CAA TAT CTT CAG GAC AAC CAA CC	GP 23 R a1	CTT TAA CAG CCT GCA CTA TGG TG	56
GP 25 F a1	GCC TTG GTC ATT CAC ATT TGA ATG	GP 25 R a1	CTG ATT GAT TGA ATG CGG CGA TG	56
GP 266 F a1	CCA GAA ACT CAA GAC TAT TGA GG	GP 266 R a1	GAC AAA GAA GGG ATA TAA TTA GGA G	56
GP 94 F a1	ATG TAT CAC AAT CAC ATT CTT GCT C	GP 94 R a1	TGT AAA ACC AAC AAG TAG TGT TGC	56
GP321 F #	GCA CAA AAC AAA CCA ACG CAA	GP321 R #	TCA CCT TGT TAT CTC CTA TGC	56
GP129 F #	GTG GTA GCA AAG TAT TCA TC	GP129 R #	CGT TAT CTG GAC TCC TTT AG	56
NL27 F	TAG AGA GCA TTA AGA AGC TGC	NL27 Ra1	TTT TTC AAA CCT TCG TAC AAG TG	56
NL27 F2	TCT TCT CAG ACA TCC ATG GCA TC	NL27 Ra2	AGA GCA GTC CTC CAT CCT TTC AC	56
Prp 1 F a1	TTT TAT TAC TCA CTC CAA AAA TAT AGG	Prp 1 R a1	GCT TAA TTA TGT GTG GTT GGT CTC	56
S1b3 F a1	ATG TTT GTC AAC TGT GCT GCG G	S1b3 R a1	AAT TAG TAA TTA GTA ATT ACC TCA GAG	56
S1b3 F a2	CAC CAT TTG AAT GGT AGG TGA AAC	S1b3 R a2	TTA AGT TGT CTG GTC CAA TCA CC	56
St 3.1 F a1	ACA ACA CTC CAA ACT TCA ACG AC	St 3.1 R a1	GAA TTG CAT AAG AGC TCC ATG AG	56
St3.2 F #	AAT CCC AGC ACC CGT ATC CAT ATC	St3.2 R #	CAG TTA TGT CGG ATT TAC TGG CTG	56
St 3.2 F a1	AGC AAC TTA GGT CAC AAC CAC AC	St 3.2 R a1	TAT CTT GAA TTG TTT CCC TGC AGC	56
S1D11-Fa1	GTT GTA ATT TCT TCA GCA AAA TTA GC	S1D11-Ra1	TTC ACG AAT CGG ACT AAA AGA TTG	56
STM3016 F	TCA GAA CAC CGA ATG GAA AAC	STM3016 R	GCT CCA ACT TAC TGG TCA AAT CC	56
DYS 271_F ^	AGG CAC TGG TCA GAA TGA AG	DYS 271_R ^	AAT GGA AAA TAC AGC TCC CC	56

Tab. 9-2: Oligonukleotide für *Pyrosequencing-Assays* und Dokumentation des jeweiligen Erfolgs.

Forward-Primer	Reverse-Primer	Sequenzier-Primer	Sequenzier-Primer Sequenz 5'-3'	Erfolg
1 T3 f bio	1 T3 ra1	1 T3 SNP 28 as	AGT GAA CTA TAA AAG TAA	ja
1 T3 f bio	1 T3 ra1	1 T3 SNP 90 as	GAA AGT CTG AAC RAT A	ja
9 I23 T7 F	9 I23 T7 R	9 I23 SNP 227+230 as	AGT TTG GAC AAG AGT ATG AGA	ja
34 J14 T7 Fa1	34 J14 T7 Ra1 bio	34 J14 T7 SNP 374	CAA TTC TTT AAC AAT GGA G	ja
34 J14 T7 Fa1	34 J14 T7 Ra1 bio	34 J14 T7 SNP 179	GAG AAG AGT TGA AGA GGA TAA AG	nein
34 J14 T7 Fa1	34 J14 T7 Ra1 bio	34 J14 T7 SNP 302	CGT CAT ATA TCT AAT TTA TC	ja
44 a10 t7 Fa1	44 a10 t7 Ra1 bio	44 t7 SNP 54	AAA TGA GKA AGA GCT GAT ATT	ja
44 a10 t7 Fa1	44 a10 t7 Ra1 bio	44 t7 SNP 174	GAA AGA GCA CTT GGA TGC	ja
44 a10 t7 Fa1	44 a10 t7 Ra1 bio	44 t7 SNP 114	CCT AAA CCC CTG AAA TTC T	ja
47-F2-T3-Aa_bio	47-F2-T3-Ba	47 F2 T3 SNP 526 as	CTT ATT TCA TCC CAA AC	nein
47-F2-T3-Aa_bio	47-F2-T3-Ba	47 F2 T3 SNP 557 as	CCC TAG TAG TCA ATA AAA TTC GAC	ja
47-F2-T3-Aa_bio	47-F2-T3-Ba	47 F2 T3 SNP 511 as	CAA ACA TGC GTA CTC CAA ATA	nein
47-F2-T3-Aa_bio	47-F2-T3-Ba	47 F2 T3 SNP 356 as	CAT CTA ATA ATA CAT TTC TAC	nein
62 I7 t3 fa1	62 I7 t3 r bio	62 T3 SNP 463	GAA AAT CAA CCC CAA ACA TGC	ja
62 I7 t3 fa1	62 I7 t3 r bio	62 T3 SNP 357	TCA AGA TTC AGG AAA GAT	nein
63 o3 t7 F bio	63 o3 t7 R	63 T7 SNP 72 as	GAG TCA TAG AGA AGT GTT G	ja
63 T7 Fa1 bio	63 t7 R	63 T7 SNP 239/240 as	TCA ATT AGA TGT ATA GCT TAG Y	ja
63 T7 Fa1 bio	63 t7 R	63 T7 SNP 328 as	CTG TAA CCC TGT GCT ATA TC	ja
66 k2 t3 f a1	66 T3 ra1 bio	66 t3 SNP 212	CCT TTG WGC TTC TAG	nein
66 k2 t3 f a1 bio	66 T3 ra1	66 t3 SNP 98 as	ATT TCT CCT TAT GCA CAC C	ja
70 B11 T7 Fa1	70 B11 T7 R bio	70 T7 SNP 334	CAA CAA CTG GTA GCA TAT C	nein
73 e8 T3 f a1	73 e8 T3 ra1 bio	73 T3 SNP 39	GGT ATA TGA AGA TCT GAT ATG A	ja
73 e8 T3 f a1	73 e8 T3 ra1 bio	73 T3 SNP 65	TTA GAA WTT TTT GTT TTA C	ja
73 e8 T3 f a1	73 e8 T3 ra1 bio	73 T3 SNP 69/70	TTT TTG TTT TAC TAC AA	ja
76 o11 t3 ca1 bio	76 o11 t3 D	76 T3 SNP 310 as	GTT TTT GTG GAG AAC CTC AAT G	ja
76 o11 t3 ca1 bio	76 o11 t3 D	76 T3 SNP 486 as	GTA TCT TGA AAA AGT TTG GGT	nein
76 o11 t3 ca1 bio	76 o11 t3 D	76 T3 SNP 286 as	CTA ATG AAG ATC AAT GAT CC	ja
76 o11 t7 A	76 011 T7 Ba1 bio	76 T7 SNP 178	CAA GAT ATG GAT TCT GTT ATT	ja
76 o11 t7 A	76 011 T7 Ba1 bio	76 T7 SNP 186	GGA TTC TGT TAT TRT TGA TGC	ja
76 o11 t7 A	76 011 T7 Ba1 bio	76 T7 SNP 144	AGG AGA TGC TCT GCC TTC TAA G	ja
81 T3 fa1	81 T3 ra1 bio	81 T3 SNP 193	CTT TCT CAA TCT CTC TTT TTC	ja
81 T3 fa1	81 T3 ra1 bio	81 T3 SNP 93 new	AGT GAT GAA ACT GGG GCA C	ja
81 T3 fa1 bio	81 T3 ra1	81 T3 SNP 218 as	TTT TTT AAC ATT ATC AAT GGA	ja
87 T3 Ca1	87 T3 Da1 bio	87 T3 SNP 109 new	GTT ATT GTC ATA GCT GGG C	ja
87 T3 Ca1	87 T3 Da1 bio	87 T3 SNP 146	GCA AAC CCA GCC ACA A	ja
87 T3 Ca1 bio	87 T3 Da1	87 T3 SNP 186 as	CTT TTT ATC AAA CAG GTG GTG TG	nein
87 T3 Ca1 bio	87 T3 Da1	87 T3 SNP 109 as	AGC AAT GGT TGT CTG GTT G	nein
87 T3 Ca2	87 T3 D bio	87 T3 SNP 433	ATT TCC ATC TTA GTC ACC	ja
106 h21 t3 fa1	106 h21 t3 ra1 bio	106 H21 T3 SNP 74	GAA AAC ACT AGG TCA TAC	nein
106 h21 t3 fa1	106 h21 t3 ra1 bio	106 H21 T3 SNP 82	CTA GGT CAT ACG TRG AGA AGC	nein
113 a17 t3 f a1	113 a17 t3 ra1 bio	113 a17 T3 Indel 166	AAT AAC CAA TCT AGG CAA TCT T	nein
113 a17 t3 f a2	113 a17 t3 ra2 bio	113 a17 T3 SNP 202	AAG AAC TGA ATA ACA TGA TC	ja
114 I24 T3 fa1	114 I24 T3 r bio	114 T3 SNP 79	ACA ACA TAT CCA ACT CTA C	ja
114 I24 T3 fa1	114 I24 T3 r bio	114 T3 SNP 54	CTT TGG CTT TTG AAC AAA GCA AAC	ja
114 I24 T3 fa1	114 I24 T3 r bio	114 T3 Indel 94	CAA CTC TAC MTT CTA AAG AAG	nein
121 T7 Ca1	121 T7 D bio	121 t7 SNP 289	CTG GTC TAC GST TTA ATA TAA	ja
121 T7 Ca1	121 T7 D bio	121 t7 SNP 401	TGG AAT AAA ATC AAT AAC AAC C	ja
122 p13 t7 Ca1	122 p13 t7 Da1 bio	122 P13 T7 SNP 140	CTG TCA TTC ACA ATA TAG TTG	nein
129 O7 T7 Ca1 bio	129 O7 T7 Da1	129 T7 SNP 247 as	CTG TTT ATG GAA TAT CTG TTG	ja
132 h9 Ca1	132 h9 Da2 bio	132 T3 SNP 317	TCT CAA TTT TGA AAC TCG TC	ja
132 h9 Ca1	132 h9 Da2 bio	132 T3 SNP 157	ATA GGA CTA GGA CTT CTG	ja
213 c14 A a1	213 T7 Ba1 bio	213 T7 SNP 273	TGT ACT TTA TGT GCA A	ja
213 c14 A a1	213 T7 Ba1 bio	213 T7 SNP 139	GTA TAA TGA GAA CCT TAT AGG TCA TGC	ja
213 c14 A a1	213 T7 Ba1 bio	213 T7 SNP 253	TAA TAG GYT GAG TTC C	ja
213 c14 C a1	213 c14 Da1 bio	213 T3 SNP 268	AGA TTT GTT ATC CTT CAA C	ja
213 c14 C a1	213 c14 Da1 bio	213 T3 SNP 286	RTT AGG ATA TTA AAG CA	ja
213 T7 Ba1 rev bio	213 T7 B	213 T7 SNP 452 as	GGA GAA AGA CAA AGC AGC TGA	ja

**Fortsetzung Tab. 9-2: Oligonukleotide für Pyrosequencing-Assays und Dokumentation des jeweiligen Erfolgs.**

Forward-Primer	Reverse-Primer	Sequenzier-Primer	Sequenzier-Primer Sequenz 5'-3'	Erfolg
228 D23 T3 f	228 D23 T3 r bio	228 D23 T3 SNP 111	CAA AAA TAT CTA CCT CGA AA	ja
228 D23 T3 f	228 D23 T3 r bio	228 D23 T3 SNP 142	GTA AAT CAT TCC GAG AAG AG	ja
228 D23 T3 f	228 D23 T3 r bio	228 D23 T3 SNP 174	CAC ACR TCC TCA TGG GC	ja
228 g19 T7 F	228 g19 T7 Ra1 bio	228 g19 T7 SNP 23	CAG TTC TAC CAT CAT CAA G	ja
228 g19 T7 F	228 g19 T7 Ra1 bio	228 g19 T7 SNP 70	ACG AAC ACT CAA TGT ACT T	ja
228 g19 T7 F	228 g19 T7 Ra1 bio	228 g19 T7 SNP 65	ACA AGC ACA ACG AAC ACT CAA	ja
261 b9 t7 F	261 T7 Ra1 bio	261 T7 SNP 174	GAA GAG GTT AAA CGT GCA GT	ja
261 b9 t7 F	261 T7 Ra1 bio	261 T7 SNP 67	GCA ATT CAC RCA AGA AAG	ja
4Cl Fa1	4Cl Ra2 bio	4Cl SNP 228	GGT AAT ATG CGT CGA TTC AG	ja
CP 105 Fa1 bio	CP 105 R a1	CP 105 SNP 144 as	CTA GGA AAC TAT TAA TGT CTT	ja
CP 135ex Fa1 bio	CP 135ex Ra1	CP 135ex SNP 187 as	ATG TGG CTG CTT ACK TCA A	ja
CP 135ex Fa1 bio	CP 135ex Ra1	CP 135ex SNP 201 as	CCC TAA TTA TTT TTT CAC AT	nein
GP 205 F a1	GP 205 R a1 bio	GP 205 SNP 1090	CCT ATG TCT CCT TAC CTC TTT	ja
GP 205 F a1	GP 205 R a1 bio	GP 205 SNP 1033	GCT TCT ACA TGG AGG CTC TTG	ja
GP 23 F a1 bio	GP 23 R a1	GP23-SNP_271_as	TCA TTC TCA AAA ACT AAA ATA G	ja
GP 23 F a1 bio	GP 23 R a1	GP23-SNP_69_as	GAT TCC CAT CTG AAA	ja
GP 25 F a1_bio	GP 25 R a1	gp25-Indel_63_as	GAA AAC TTC AAA GCC ACC	ja
GP 25 F a1_bio	GP 25 R a1	gp25-SNP_111_as	CGT CAA TCG GGT T	ja
GP 25 F a1_bio	GP 25 R a1	gp25-SNP_167_as	CTA GAC GTT GAA AT	ja
GP 266 F a1	GP 266 R a1 bio	GP 266 SNP 158	GAA ATK ATT CTG GCA CGA GTC	ja
GP 266 F a1	GP 266 R a1 bio	GP 266 SNP 232	CGA TAC CGA GTT TCC TKA AAT	nein
GP 266 F a1	GP 266 R a1 bio	GP 266 SNP 130	CAA GAC TAT TGA GGT TCC T	nein
S1D11-Fa1	S1D11-Ra1_bio	S1D11-SNP_183	CAG CAA AAT TAG CAA AAG AAG	ja
S1D11-Fa1	S1D11-Ra1_bio	S1D11-SNP_308	CTA TTG GAG AGA AAT GCG AAA AG	ja
S1b3 Fa2	S1b3 Ra2 bio	S1b3 SNP 304	CTC AGT GTC CAT ATT AGA AC	ja
S1b3 Fa2	S1b3 Ra2 bio	S1b3 SNP 143	CCC ATC CAT TAT TAT TTC TC	ja
St 3.1 F a1 bio	St 3.1 R a1	St 3.1 SNP 176 as	CTA GTA AGA CCT AAC TAA GG	nein
St 3.1 F a1 bio	St 3.1 R a1	St 3.1 SNP 204 as	ATC TGA AAA TAT GTA ACA CCC	ja
St 3.2 F a1	St 3.2 R a1 bio	St 3.2 SNP 127	AGC AGG CTC AGA GGA GAC CAG ACC	nein
St 3.2 F a1	St 3.2 R a1 bio	St 3.2 SNP 157	CAA TGT TAT ACT AGA TAA TGT C	ja
STM F bio	STM R	STM3016_fragment2_as	GAT TCC ACC CCT ACC CTT CTT	ja

**Tab. 9-3: Oligonukleotide für *Minisequencing*-Assays und Dokumentation des jeweiligen Erfolgs.** Die Oligonukleotidsequenzen der PCR-Primer können der Tabelle 9-1 entnommen werden.

Forward-Primer	Reverse-Primer	Extension Primer	Sequenz des Extension Primers 5'-3'	Erfolg
121o1T7_Ca1	121o1T7_D	121o1T7_SNP-401_expr	TTT GGA ATA AAA TCA ATA ACA ACC	ja
213c14T7_Ba1-rev	213c14T7_B	213c14T7_SNP-452_expr	GCT GCT TTT GCA GTT GCA TCC	ja
213c14T7_Aa1	213c14T7_Ba1	213c14T7_SNP-273_expr	ATG TAC TTT ATG TGC AA	ja
44a10T7_Fa1	44a10T7_Ra1	44a10T7_SNP-114_expr	CCT AAA CCC CTG AAA TTC T	ja
44a10T7_Fa1	44a10T7_Ra1	44a10T7_SNP-174_expr	GAA AGA GCA CTT GGA TGC AAC	ja
66k2T3_fa1	66k2T3_ra1	66k2T3_SNP-212_expr	AGG CCT TTG TGC TTC TAG GC	ja
62l7t3_fa1	62l7t3_r	62l7T3_SNP-463_expr	AAT CAA CCC CAA ACA TGC AGA	ja
62l7t3_fa1	62l7t3_r	62l7T3_SNP-357_expr	TCA AGA TTC AGG AAA GAT	ja
106h21t3_fa1	106h21t3_ra1	106h21T3_SNP-74_expr	AAA CAC TAG GTC ATA CGT	ja
228g19T7_F	228g19T7_Ra1	228g19T7_SNP-70_expr	ACG AAC ACT CAA TGT ACT T	ja
87d17T3_Ca1	87d17T3_Da1	87d17T3_SNP-109_expr	GTT ATT GTC ATA GCT GGG CAT G	ja
70b11T7_Fa1	70b11T7_R	70b11T7_SNP-334	CAA CAA CTG GTA GCA TAT C	ja
114l24T3_fa1	114l24T3_r	114l24T3_Indel-94_expr	CCA ACT CTA CAT TCT AAA GAA GTG	ja
GP23_Fa1	GP23_Ra1	GP23-SNP_271_expr	CTA ACT AAA TCC TAG GTC TAA A	ja
GP23_Fa1	GP23_Ra1	GP23-SNP_271_expr_as	CTC AAA AAC TAA AAT AGT TCC	ja
GP266_Fa1	GP266_Ra1	GP266_SNP-158_expr	GAA ATT ATT CTG GCA CGA GTC	ja
CP135ex_Fa1	CP135ex_Ra1	CP135ex_SNP-201-as_expr	CCC TAA TTA TTT TTT CAC ATG TG	ja
DYS_271_F	DYS_271_R	DYS_271_SNP-168_expr	ATT TCT TTG TTA ACA AAA GTC C	ja

**Tab. 9-4: Reaktionsbedingungen der *Minisequencing*-Assays.** Es sind die genutzten SNPs/Indels, die Gradienten, die Temperatur, das Injektionsvolumen, das Instrument und die Fluoreszenzmoleküle angegeben. Die Flussrate betrug beim Varian-Instrument 0,9ml/min und beim 16-Array 2,5µl/min.

Polymorphismus	Gradient	Temp. [°C]:	Vol. [µl]	HPLC	Fluorophore
121o1T7_SNP-401	23% B in 0,5 min, 23-31% B in 4,5 min, 95% B in 1,5 min, 23% B in 1 min	68	7	Varian	kein
213c14T7_SNP-452	25% B in 0,5 min, 25-33% B in 3,0 min, 95% B in 1,5 min, 25% B in 1 min	68	7	Varian	kein
213c14T7_SNP-273	22% B in 0,5 min, 22-30% B in 3,0 min, 95% B in 1,5 min, 22% B in 1 min	68	7	Varian	kein
44a10T7_SNP-114	23% B in 0,5 min, 23-29% B in 3,0 min, 95% B in 1,5 min, 23% B in 1 min	68	7	Varian	kein
44a10T7_SNP-174	24% B in 0,5 min, 24-30% B in 3,0 min, 95% B in 1,5 min, 24% B in 1 min	70	7	Varian	kein
66k2T3_SNP-212	25% B in 0,5 min, 25-31% B in 3,0 min, 95% B in 1,5 min, 25% B in 1 min	68	7	Varian	kein
62I7T3_SNP-463	24% B in 0,5 min, 24-30% B in 3,0 min, 95% B in 1,5 min, 24% B in 1 min	68	7	Varian	kein
62I7T3_SNP-357	24% B in 0,5 min, 24-30% B in 3,0 min, 95% B in 1,5 min, 24% B in 1 min	70	7	Varian	kein
106h21T3_SNP-74	24% B in 0,5 min, 24-30% B in 3,0 min, 95% B in 1,5 min, 24% B in 1 min	68	7	Varian	kein
228g19T7_SNP-70	25% B in 0,5 min, 25-31% B in 3,0 min, 95% B in 1,5 min, 25% B in 1 min	70	7	Varian	kein
87d17T3_SNP-109	24% B in 0,5 min, 24-30% B in 3,0 min, 95% B in 1,5 min, 24% B in 1 min	70	7	Varian	kein
70b11T7_SNP-334	23% B in 0,5 min, 23-31% B in 4,5 min, 95% B in 1,5 min, 23% B in 1 min	70	12	Varian	kein
114i24T3_Indel-94	20,5% B in 0,5 min, 20,5-27,5% B in 3,5 min, 95% B in 1,5 min, 20,5% B in 1 min	70	12	Varian	kein
GP23-SNP_271	23% B in 0,5 min, 23-31% B in 4,5 min, 95% B in 1,5 min, 23% B in 1 min	60, 70, 80, 90	7	Varian	kein
GP23-SNP_271_as	24% B in 0,5 min, 24-30% B in 3,0 min, 95% B in 1,5 min, 24% B in 1 min	70	7	Varian	kein
GP266_SNP-158	24% B in 0,5 min, 24-30% B in 3,0 min, 95% B in 1,5 min, 24% B in 1 min	68	7	Varian	kein
CP135ex_SNP-201-as	24% B in 0,5 min, 24-30% B in 3,0 min, 95% B in 1,5 min, 24% B in 1 min	68	7	Varian	kein
121o1T7_SNP-401	8,8%-13% B in 15 min	80	1	16-Array	FAM, ROX
213c14T7_SNP-273	8,8%-13% B in 15 min	80	1	16-Array	HEX
44a10T7_SNP-114	8,8%-13% B in 15 min	80	1	16-Array	FAM, ROX, TAMRA
66k2T3_SNP-212	8,8%-13% B in 15 min	80	1	16-Array	FAM
DYS_271_SNP-168	5%-16% B in 15 min	60	1	16-Array	FAM, ROX, HOX, NED, TAMRA

**Tab. 9-5: Oligonukleotide zur Kalibrierung der *Minisequencing*-Ergebnisse.**

Template	Sequenz des Templates 5'-3'
Temp.-106h21t3/74_G	TTC TCC ACG TAT GAC CTA GTG TTT TCT T
Temp.-106h21t3/74_A	TTC TCT ACG TAT GAC CTA GTG TTT TCT T
Temp.-66k2T3/212_A	GTG AAT GCC TAG AAG CAC AAA GGC CTC ATA
Temp.-66k2T3/212_T	GTG AAA GCC TAG AAG CAC AAA GGC CTC ATA
Temp.-62I7t3/463_C	GAT GTC GTC TGC ATG TTT GGG GTT GAT TTT CTA
Temp.-62I7t3/463_T	GAT GTC ATC TGC ATG TTT GGG GTT GAT TTT CTA

**Tab. 9-6: Sequenzen der DNA-Sonden bei der allelspezifischen Hybridisierung auf DNA-Chips.** Alle Oligonukleotide waren am 5'-Ende mit NH<sub>2</sub>/SH-C<sub>6</sub>-Linkern versehen.

Name	DNA-Sonden Sequenz 5'-3'	Name	DNA-Sonden Sequenz 5'-3'
213-T3/268+269_s1_CC	AATATCCTAACCAGTGTGAA	213-T7/452_as1_A	AGTTGCATCCATCAGCTGCTTT
213-T3/268+269_s1_TA	AATATCCTAATAACTAGTGTGAA	213-T7/452_as1_T	AGTTGCATCCCTCAGCTGCTTT
213-T3/268+269_s1_AG	AATATCCTAAAGACTAGTGTGAA	213-T7/452_as1_C	AGTTGCATCCCTCAGCTGCTTT
213-T3/268+269_s1_GT	AATATCCTAAGTACTAGTGTGAA	213-T7/452_as1_G	AGTTGCATCCGTCAGCTGCTTT
213-T3/268+269_s2_CC	TTTAATATCCTAACCAGTGTGAA	213-T7/452_as2_A	TGCAGTTGCATCCATCAGCTGC
213-T3/268+269_s2_TA	TTTAATATCCTAATAACTAGTGTGAA	213-T7/452_as2_T	TGCAGTTGCATCCCTCAGCTGC
213-T3/268+269_s2_AG	TTTAATATCCTAAAGACTAGTGTGAA	213-T7/452_as2_C	TGCAGTTGCATCCCTCAGCTGC
213-T3/268+269_s2_GT	TTTAATATCCTAAGTACTAGTGTGAA	213-T7/452_as2_G	TGCAGTTGCATCCGTCAGCTGC

Fortsetzung Tab. 9-6: Sequenzen der DNA-Sonden bei allelspezifischer Hybridisierung auf DNA-Chips

Name	DNA-Sonden Sequenz 5'-3'	Name	DNA-Sonden Sequenz 5'-3'
213-T3/268+269_s3_CC	TGCTTTAATATCCTAACCCTA	213-T7/452_as3_A	TTTTGCAGTTGCATCCATCAGC
213-T3/268+269_s3_TA	TGCTTTAATATCCTAATAACTA	213-T7/452_as3_T	TTTTGCAGTTGCATCCTTCAGC
213-T3/268+269_s3_AG	TGCTTTAATATCCTAAAGACTA	213-T7/452_as3_C	TTTTGCAGTTGCATCCCTCAGC
213-T3/268+269_s3_GT	TGCTTTAATATCCTAAGTACTA	213-T7/452_as3_G	TTTTGCAGTTGCATCCGTCAGC
213-T3/268+269_as1_GG	TTCAACTAGTGGTTAGGATATT	44/174_s1_A	TCCAAGGGAGAGTTGCATCCAA
213-T3/268+269_as1_TA	TTCAACTAGTTATTAGGATATT	44/174_s1_T	TCCAAGGGAGTGTGCATCCAA
213-T3/268+269_as1_CT	TTCAACTAGTCTTTAGGATATT	44/174_s1_C	TCCAAGGGAGCGTTGCATCCAA
213-T3/268+269_as1_AC	TTCAACTAGTACTTTAGGATATT	44/174_s1_G	TCCAAGGGAGGGTTGCATCCAA
213-T3/268+269_as2_GG	TCCTTCAACTAGTGGTTAGGAT	44/174_s2_A	GTTTCCAAGGGAGAGTTGCATC
213-T3/268+269_as2_TA	TCCTTCAACTAGTTATTAGGAT	44/174_s2_T	GTTTCCAAGGGAGTGTGCATC
213-T3/268+269_as2_CT	TCCTTCAACTAGTCTTTAGGAT	44/174_s2_C	GTTTCCAAGGGAGCGTTGCATC
213-T3/268+269_as2_AC	TCCTTCAACTAGTACTTTAGGAT	44/174_s2_G	GTTTCCAAGGGAGGGTTGCATC
213-T3/268+269_as3_GG	TTATCCTTCAACTAGTGGTTAG	44/174_s3_A	CTTGTTTCCAAGGGAGAGTTGC
213-T3/268+269_as3_TA	TTATCCTTCAACTAGTTATTAG	44/174_s3_T	CTTGTTTCCAAGGGAGTGTGC
213-T3/268+269_as3_CT	TTATCCTTCAACTAGTCTTTAG	44/174_s3_C	CTTGTTTCCAAGGGAGCGTTGC
213-T3/268+269_as3_AC	TTATCCTTCAACTAGTACTTAG	44/174_s3_G	CTTGTTTCCAAGGGAGGGTTGC
213-T7/452_s1_A	AAGCAGCTGAAGGATGCAACTG	44/174_as1_A	TGGATGCAAACTCCCTTGAA
213-T7/452_s1_T	AAGCAGCTGATGGATGCAACTG	44/174_as1_T	TGGATGCAACTCTCCCTTGAA
213-T7/452_s1_C	AAGCAGCTGACGGATGCAACTG	44/174_as1_C	TGGATGCAACCCTCCCTTGAA
213-T7/452_s1_G	AAGCAGCTGAGGGATGCAACTG	44/174_as1_G	TGGATGCAACGCTCCCTTGAA
213-T7/452_s2_A	ACAAAGCAGCTGAAGGATGCAA	44/174_as2_A	ACTTGGATGCAAACTCCCTTG
213-T7/452_s2_T	ACAAAGCAGCTGATGGATGCAA	44/174_as2_T	ACTTGGATGCAACTCTCCCTTG
213-T7/452_s2_C	ACAAAGCAGCTGACGGATGCAA	44/174_as2_C	ACTTGGATGCAACCCTCCCTTG
213-T7/452_s2_G	ACAAAGCAGCTGAGGGATGCAA	44/174_as2_G	ACTTGGATGCAACGCTCCCTTG
213-T7/452_s3_A	AAGACAAAGCAGCTGAAGGATG	44/174_as3_A	AGCACTTGGATGCAAACTCCC
213-T7/452_s3_T	AAGACAAAGCAGCTGATGGATG	44/174_as3_T	AGCACTTGGATGCAAACTCCC
213-T7/452_s3_C	AAGACAAAGCAGCTGACGGATG	44/174_as3_C	AGCACTTGGATGCAACCCTCCC
213-T7/452_s3_G	AAGACAAAGCAGCTGAGGGATG	44/174_as3_G	AGCACTTGGATGCAACGCTCCC

Tab. 9-7: Sequenzen der immobilisierten Primer bei der Primer-Elongation auf DNA-Chips.

Name	DNA-Template Sequenz 5'-3'
213-T3/268+269_el_GG	SH-C6-TATGAGAAGCAGTATGACTAAAAAAGATTTGTTATCCTTCAACTAGTGG
213-T3/268+269_el_TA	SH-C6-TATGAGAAGCAGTATGACTAAAAAAGATTTGTTATCCTTCAACTAGTTA
213-T3/268+269_el_CT	SH-C6-TATGAGAAGCAGTATGACTAAAAAAGATTTGTTATCCTTCAACTAGTCT
213-T3/268+269_el_AC	SH-C6-TATGAGAAGCAGTATGACTAAAAAAGATTTGTTATCCTTCAACTAGTAC
213-T7/452_el_A	SH-C6-AGCAGCTCTTCTTTCTCTGCTTCAACGGCTGCTTTTGCAGTTGCATCCA
213-T7/452_el_T	SH-C6-AGCAGCTCTTCTTTCTCTGCTTCAACGGCTGCTTTTGCAGTTGCATCCT
213-T7/452_el_C	SH-C6-AGCAGCTCTTCTTTCTCTGCTTCAACGGCTGCTTTTGCAGTTGCATCCC
213-T7/452_el_G	SH-C6-AGCAGCTCTTCTTTCTCTGCTTCAACGGCTGCTTTTGCAGTTGCATCCG
44/174_el_A	SH-C6-CTCCCTGCTACCATTTTGATATTTCCCTGAAAGAGCACTTGGATGCAACA
44/174_el_T	SH-C6-CTCCCTGCTACCATTTTGATATTTCCCTGAAAGAGCACTTGGATGCAACT
44/174_el_C	SH-C6-CTCCCTGCTACCATTTTGATATTTCCCTGAAAGAGCACTTGGATGCAACC
44/174_el_G	SH-C6-CTCCCTGCTACCATTTTGATATTTCCCTGAAAGAGCACTTGGATGCAACG

Tab. 9-8: Oligonukleotide für *Minisequencing-Assays* und Dokumentation des jeweiligen Erfolgs. Die Oligonukleotidsequenzen der PCR-Primer können der Tabelle 9-1 entnommen werden.

genutzter Polymorphismus	ASO-Primer	unspezifischer Primer	Erfolg
BA1m23_SNP-88,90,94	1 M23 map al50 F	1 M23 map R	ja
BA106h21t3_SNP-94	106_SNP94_al50+54at_f	106 h21 t3 ra2	nein
213c14T7_dflp (unbekannter Indel)	213 c14 T7_Ba1re	213 c14 T7_B	ja

**Tab. 9-9: Dispensionsabfolgen der Nukleotide zur Genotypisierung von Indels, trialleischen SNPs und mehreren aufeinander folgenden SNPs mit Pyrosequencing.**

Polymorphismus	Sequenz und Dipensionsreihenfolge	
BA213c14t3/SNP268+269	1. Allel	T A G T G G T T
	2. Allel	T A G T T A T T
	Dispension	C T A G T G T A C T
BA114i24t3/Indel93	1. Allel	T G T T A A G A A T A G
	2. Allel	T G - - - - A T A G
	Dispension	G T G A T A G
BA9i23t7/SNP227+230	1. Allel	C A G C A
	2. Allel	A A G T A
	Dispension	T C A T G C T G A
S1b3/SNP143+145	1. Allel	A T G C C A
	2. Allel	A G G T C A
	Dispension	C A T G C T G C A
GP23/SNP271	1. Allel	T T C C A T T T A C
	2. Allel	T T C C T T T A C
	3. Allel	T T C C G T T T A C
	Dispension	G T C A T G C T A C
GP25/Indel63	1. Allel	G A C C G T C
	2. Allel	G - - - T C
	Dispension	C G A T G C
BA87d17T3/SNP109	1. Allel	A T G T A C
	2. Allel	A T G C A C
	3. Allel	A T G G A C
	Dispension	C A T G T C G A C
STM3016	Bande 2	T T C
	Bande 3	C T C
	Dispension	G C T C

**Tab. 9-10: Liste aller identifizierten BAC-Klone mit RGLs, aufgeschlüsselt nach den zum Screenen der BAC-Bibliothek genutzten DNA-Sonden.**

Sonde	BAC	Sonde	BAC	Sonde	BAC	Sonde	BAC	Sonde	BAC
RGL-121o1	3 G5	RGL-47f2	228 L22	St.1.2.1	112 C9	St.3.3.13	97 O7	St.1.2.4	84 B24
RGL-121o1	38 C3	RGL-47f2	243 G1	St.1.2.1	123 D14	St.3.3.13	109 B4	St.1.2.4	84 F23
RGL-121o1	18 O20	RGL-47f2	247 L20	St.1.2.1	127 D11	St.3.3.13	115 G1	St.1.2.4	88 G12
RGL-121o1	27 C15	RGL-47f2	249 L16	St.1.2.1	132 E15	St.3.3.13	116 E13	St.1.2.4	90 M14
RGL-121o1	36 L5	RGL-47f2	254 H10	St.1.2.1	133 B4	St.3.3.13	120 L20	St.1.2.4	93 H12
RGL-121o1	76 O11	RGL-47f2	259 P17	St.1.2.1	144 J15	St.3.3.13	128 N3	St.1.2.4	94 D15
RGL-121o1	89 B23	RGL-47f2	261 B9	St.1.2.1	148 M13	St.3.3.13	228 G19	St.1.2.4	95 H2
RGL-121o1	87 D17	St.1.2.1	9 N6	St.1.2.1	152 H21	St.3.3.13	229 G14	St.1.2.4	95 I14
RGL-121o1	111 O5	St.1.2.1	22 B15	St.1.2.1	156 O8	St.3.3.13	232 H21	St.1.2.4	106 H21
RGL-121o1	132 H9	St.1.2.1	51 K12	St.1.2.1	169 J3	St.3.3.13	235 M21	St.1.2.4	106 L5
RGL-121o1	121 O1	St.1.2.1	117 H8	St.1.2.1	180 C13	St.3.3.13	239 J19	St.1.2.4	108 L20
RGL-121o1	122 P13	St.1.2.1	116 J10	St.1.2.1	185 L11	St.3.3.13	238 H17	St.1.2.4	109 F4
RGL-121o1	188 E11	St.1.2.1	157 F6	St.1.2.1	198 N19	St.1.2.4	8 E9	St.1.2.4	113 A17
RGL-121o1	199 O5	St.1.2.1	202 K7	St.1.2.1	218 B7	St.1.2.4	10 C7	St.1.2.4	113 M7
RGL-121o1	203 N11	St.1.2.1	213 C4	St.1.2.1	221 N19	St.1.2.4	13 B14	St.1.2.4	114 H6
RGL-121o1	213 C14	St.1.2.1	228 D23	St.1.2.1	225 B14	St.1.2.4	14 M20	St.1.2.4	115 E10
RGL-121o1	215 G18	St.1.2.1	258 F10	St.1.2.1	229 C3	St.1.2.4	19 E4	St.1.2.4	119 J20
RGL-121o1	214 H10	St.1.2.1	3 G20	St.1.2.1	235 L16	St.1.2.4	23 N20	St.1.2.4	123 N15
RGL-121o1	209 K7	St.1.2.1	4 F4	St.1.2.1	241 N12	St.1.2.4	33 K11	St.1.2.4	126 A1
RGL-121o1	259 K7	St.1.2.1	11 C21	St.1.2.1	243 N15	St.1.2.4	37 H23	St.1.2.4	128 D6
RGL-121o1	163 P19	St.1.2.1	12 N9	St.1.2.1	250 E16	St.1.2.4	37 I12	St.1.2.4	130 D12
RGL-47f2	1 M14	St.1.2.1	23 D20	St.1.2.1	250 G19	St.1.2.4	41 F21	St.1.2.4	178 L17
RGL-47f2	9 I23	St.1.2.1	24 G10	St.1.2.1	255 K20	St.1.2.4	41 L17	St.1.2.4	178 O4
RGL-47f2	7 A7	St.1.2.1	27 I17	St.1.2.1	257 K23	St.1.2.4	44 A10	St.1.2.4	207 D11

Fortsetzung Tab. 9-10: Liste aller identifizierter BAC-Klone mit RGLs

Sonde	BAC	Sonde	BAC	Sonde	BAC	Sonde	BAC	Sonde	BAC
RGL-47f2	12 E7	St.1.2.1	30 F9	St.1.2.1	259 B20	St.1.2.4	46 P17	St.1.2.4	223 J22
RGL-47f2	18 B3	St.1.2.1	32 D21	St.3.3.13	5 G19	St.1.2.4	47 B18	St.1.2.4	229 E5
RGL-47f2	34 J23	St.1.2.1	33 L3	St.3.3.13	8 H4	St.1.2.4	47 F22	St.1.2.4	234 M10
RGL-47f2	46 D8	St.1.2.1	34 F6	St.3.3.13	12 P7	St.1.2.4	48 B5	St.1.2.4	235 M20
RGL-47f2	48 A15	St.1.2.1	34 H3	St.3.3.13	16 A20	St.1.2.4	48 H10	St.1.2.4	238 G9
RGL-47f2	46 M5	St.1.2.1	37 H22	St.3.3.13	17 F21	St.1.2.4	48 O12	St.1.2.4	238 H2
RGL-47f2	44 I21	St.1.2.1	39 C16	St.3.3.13	18 G20	St.1.2.4	54 D14	St.1.2.4	238 F8
RGL-47f2	55 I2	St.1.2.1	42 P4	St.3.3.13	18 I22	St.1.2.4	54 N6	St.1.2.4	241 A18
RGL-47f2	63 M13	St.1.2.1	46 D15	St.3.3.13	18 O5	St.1.2.4	58 L18	St.1.2.4	241 F7
RGL-47f2	65 F5	St.1.2.1	52 I9	St.3.3.13	30 P15	St.1.2.4	60 P21	St.1.2.4	243 H20
RGL-47f2	70 B11	St.1.2.1	53 D3	St.3.3.13	31 N11	St.1.2.4	61 L21	St.1.2.4	243 K12
RGL-47f2	73 E8	St.1.2.1	54 I16	St.3.3.13	34 J14	St.1.2.4	62 L7	St.1.2.4	250 E10
RGL-47f2	114 I24	St.1.2.1	56 B6	St.3.3.13	35 H22	St.1.2.4	63 O3	St.1.2.4	250 L18
RGL-47f2	108 E10	St.1.2.1	65 H2	St.3.3.13	41 B2	St.1.2.4	64 E6	St.1.2.4	255 H14
RGL-47f2	164 K13	St.1.2.1	66 O6	St.3.3.13	47 I8	St.1.2.4	65 M3	St.1.2.4	259 O14
RGL-47f2	188 P15	St.1.2.1	67 C12	St.3.3.13	49 E16	St.1.2.4	66 K2	St.1.2.4	260 A19
RGL-47f2	168 D15	St.1.2.1	73 P13	St.3.3.13	56 K5	St.1.2.4	67 F13	St.1.2.4	262 M4
RGL-47f2	177 B10	St.1.2.1	75 H12	St.3.3.13	58 G24	St.1.2.4	67 N2	St.1.2.4	262 M5
RGL-47f2	202 B23	St.1.2.1	83 B13	St.3.3.13	59 G3	St.1.2.4	76 E7		
RGL-47f2	218 O11	St.1.2.1	83 C11	St.3.3.13	70 O17	St.1.2.4	76 J10		
RGL-47f2	256 E8	St.1.2.1	88 B3	St.3.3.13	71 G1	St.1.2.4	78 N17		
RGL-47f2	218 C1	St.1.2.1	99 N10	St.3.3.13	78 G20	St.1.2.4	81 L15		
RGL-47f2	219 K9	St.1.2.1	107 O21	St.3.3.13	83 O19	St.1.2.4	82 L24		

**Tab. 9-11: Ergebnisse der Datenbankanalysen (BlastN) der untersuchten BAC-Endsequenzen und der in diesen Loci durch vergleichendes Sequenzieren in 28 verschiedenen Genotypen identifizierten SNPs und Indels.** Ausgewiesene Homologien wurden ab 100pb langen Übereinstimmungen und einem e-Wert kleiner  $10^{-10}$  angenommen.

Region	Datenbankhomologie	analysierte Länge [bp]	Anzahl SNPs	Anzahl Indels	
132 H9	T3	hypothetisches Gen	671	17	0
132 H9	T7	Resistenzgen	0	-	-
213 C14	T3	keine Homologie	500	24	1
213 C14	T7	keine Homologie	472	46	0
76 O11	T3	keine Homologie	510	43	5
76 O11	T7	keine Homologie	413	29	0
87 D17	T3	keine Homologie	550	12	1
87 D17	T7	keine Homologie	0	-	-
121 O1	T3	keine Homologie	373	13	1
121 O1	T7	Resistenzgen	464	34	1
122 P13	T3	keine Homologie	0	-	-
122 P13	T7	RNA-Polymerase Gen	282	5	0
1 M23	T3	keine Homologie	515	22	4
1 M23	T7	keine Homologie	0	-	-
7 A7	T7	keine Homologie	274	8	1
12 E7	T3	Transposongen	0	-	-
12 E7	T7	keine Homologie	0	-	-
18 B3	T3	keine Homologie	0	-	-
18 B3	T7	Retrotransposongen	522	103	0
34 J23	T3	keine Homologie	0	-	-
34 J23	T7	Resistenzgen	0	-	-
46 D8	T3	keine Homologie	441	65	3
46 D8	T7	keine Homologie	0	-	-

Fortsetzung Tab. 9-11: Datenbankanalysen und identifizierte SNPs und Indels.

Region	Datenbankhomologie	analysierte Länge [bp]	Anzahl SNPs	Anzahl Indels	
47 F2	T3	keine Homologie	617	64	7
47 F2	T7	Resistenzgen	0	-	-
65 F5	T3	keine Homologie	291	3	0
70 B11	T3	keine Homologie	0	-	-
70 B11	T7	Resistenzgen	419	13	2
73 E8	T3	keine Homologie	350	28	1
73 E8	T7	hypothetisches Gen	0	-	-
114 I24	T3	keine Homologie	269	8	3
114 I24	T7	keine Homologie	197	13	0
168 D15	T3	Retrotransposongen	363	27	0
168 D15	T7	keine Homologie	421	58	1
202 B23	T3	Polyproteingen	405	6	0
202 B23	T7	keine Homologie	0	-	-
218 O11	T3	keine Homologie	0	-	-
218 O11	T7	Resistenzgen	0	-	-
219 K9	T7	keine Homologie	441	14	2
261B9	T3	Phosphatasegen	350	5	1
261B9	T7	hypothetisches Gen	380	21	1
9 N6	T3	Vetispiradienesynthasegen	460	8	1
9 N6	T7	keine Homologie	400	16	2
32 D22	T3	keine Homologie	0	-	-
32 D22	T7	keine Homologie	0	-	-
42 P4	T3	keine Homologie	490	17	0
42 P4	T7	Retrotransposongen	0	-	-
51 K12	T3	keine Homologie	0	-	-
51 K12	T7	keine Homologie	291	17	5
52 I9	T7	hypothetisches Gen	197	2	0
88 B3	T3	Resistenzgen	0	-	-
88 B3	T7	keine Homologie	110	10	0
116 J10	T3	Resistenzgen	405	21	0
116 J10	T7	keine Homologie	450	0	0
117 H8	T3	keine Homologie	0	-	-
117 H8	T7	Resistenzgen	521	0	0
157 F6	T3	Retroelement Polyproteingen	299	16	0
157 F6	T7	keine Homologie	503	5	1
202 K7	T3	Resistenzgen	236	0	0
202 K7	T7	keine Homologie	0	-	-
225 K20	T3	Resistenzgen	0	-	-
225 K20	T7	Polyproteingen	0	-	-
228 D23	T3	keine Homologie	274	14	5
228 D23	T7	keine Homologie	474	6	2
37 I12	T3	keine Homologie	0	-	-
37 I12	T7	keine Homologie	0	-	-
44 A10	T3	keine Homologie	976	0	0
44 A10	T7	hypothetisches Gen	500	18	1
47 B18	T3	keine Homologie	0	-	-
47 B18	T7	keine Homologie	0	-	-
48 O12	T3	keine Homologie	418	14	2
48 O12	T7	keine Homologie	0	-	-
54 N6	T3	keine Homologie	0	-	-
54 N6	T7	keine Homologie	0	-	-
62 L7	T3	keine Homologie	489	6	0
62 L7	T7	keine Homologie	0	-	-
63 O3	T3	EMB 30 Gen	423	0	0

Fortsetzung Tab. 9-11: Datenbankanalysen und identifizierte SNPs und Indels.

Region	Datenbankhomologie	analysierte Länge [bp]	Anzahl SNPs	Anzahl Indels	
63 O3	T7	keine Homologie	341	15	2
66 K2	T3	hypothetisches Gen	400	10	1
66 K2	T7	Resistenzgen	502	13	2
67 N2	T3	keine Homologie	0	-	-
67 N2	T7	keine Homologie	511	0	0
81 L15	T3	keine Homologie	260	13	0
81 L15	T7	keine Homologie	0	-	-
106 H21	T3	NADP Oxidoreduktase Gen	275	9	2
106 H21	T7	Retroelement Polyproteingen	520	0	0
106 L5	T3	Resistenzgen	0	-	-
106 L5	T7	Resistenzgen	0	-	-
113 A17	T3	keine Homologie	350	9	2
113 A17	T7	hypothetisches Gen	943	0	0
113 M7	T3	Resistenzgen	0	-	-
113 M7	T7	keine Homologie	238	5	1
5 G19	T3	Resistenzgen	0	-	-
5 G19	T7	Resistenzgen	0	-	-
17 F21	T3	keine Homologie	0	-	-
17 F21	T7	pararetrovirusähnliches Gen	413	0	0
18 P5	T3	keine Homologie	265	0	0
18 P5	T7	keine Homologie	0	-	-
30 P15	T3	Resistenzgen	438	18	0
30 P15	T7	Hitzeschockgen	388	18	7
31 N11	T3	Resistenzgen	532	23	0
31 N11	T7	keine Homologie	563	9	3
34 J14	T7	keine Homologie	417	35	1
35 H22	T3	Resistenzgen (NL27)	0	-	-
35 H22	T7	keine Homologie	0	-	-
41 B2	T3	Resistenzgen	0	-	-
41 B2	T7	keine Homologie	0	-	-
71 G1	T3	keine Homologie	0	-	-
71 G1	T7	Retrotransposongen	0	-	-
109 B4	T3	keine Homologie	0	-	-
109 B4	T7	keine Homologie	490	10	5
228 G19	T3	Resistenzgen	0	-	-
228 G19	T7	keine Homologie	518	16	1
129 O7	T3	keine Homologie	206	6	1
129 O7	T7	keine Homologie	406	11	0
106 C14	T3	keine Homologie	490	25	1
106 C14	T7	Serine/Threonine Kinase Gen	530	27	0
insgesamt		28402	1123	83	

**Tab. 9-12: Ergebnisse ( $\rho$ - und  $R^2$ -Werte) der Korrelationsanalysen zur Identifizierung von QTLs.** Bei den untersuchten Evaluierungsdaten handelt sich bei der Reife um den Mittelwert aus den Jahren 1999 bis 2001, bei den AUDPC-Resistenzwerten und der reifekorrigierten Resistenz wurden jeweils die Jahre 2000 und 2001 getrennt und gemeinsam analysiert. Es sind die Ergebnisse gezeigt, bei denen alle jeweils vorhandenen Allelkombinationen gegeneinander getestet worden sind (Kap. 2.7.3.). Die Korrelationen wurde für folgende Populationen durchgeführt: NxL (c) = cases und controls Nikita x Leyla; NxL = F1 Nikita x Leyla; ExL = F1 Escort x Leyla; NxL + ExL (c) cases und controls der beiden Populationen; NxL + ExL = F1 der beiden Populationen.

LG	Locus/Marker	Population	Reife MW	Resistenz (AUDPC)			Resistenz ohne Reifeinfluss					
				2000	2001	MW	2000	$R^2$	2001	$R^2$	MW	$R^2$
I	BA62L7T3/463	NxL (c)	0.161	0.197	0.092	0.094	0.353	10	0.200	14	0.169	15
		NxL+ExL (c)	0.398	0.206	0.156	0.166	0.343	7	0.344	7	0.328	7
I	BA114I24T3/79	NxL (c)	0.260	0.411	0.139	0.213	0.662	3	0.533	4	0.586	3
I	BA114I24/54	ExL	0.832	0.649	0.336	0.416	0.932	0	0.347	1	0.621	0
II	GP23/69	NxL (c)	0.537	0.509	0.732	0.656	0.256	4	0.861	0	0.442	2
		NxL+ExL (c)	0.658	0.710	0.912	0.802	0.997	0	0.878	0	0.938	0
II	GP23/271	NxL (c)	0.389	0.159	0.044	0.056	0.140	16	0.006	34	0.014	30
		NxL	0.706	0.649	0.368	0.187	0.133	6	0.019	11	0.020	11
II	GP205/1033	NxL (c)	0.744	0.895	0.828	0.913	0.917	0	0.972	0	0.936	0
		NxL	0.514	0.476	0.787	0.680	0.623	0	0.665	0	0.951	0
II	GP205/1090	NxL (c)	0.560	0.117	0.017	0.049	0.025	21	0.000	44	0.000	39
II	St3.1/204	NxL (c)	0.742	0.046	0.108	0.090	0.005	29	0.033	20	0.011	25
		NxL	0.945	0.227	0.233	0.182	0.075	7	0.046	9	0.040	9
II	St3.2/157	NxL (c)	0.380	0.168	0.895	0.651	0.636	3	0.246	9	0.914	1
		NxL+ExL (c)	0.386	0.492	0.470	0.533	0.868	1	0.058	12	0.351	5
III	4CL/228 (=S1b3/143)	NxL (c)	0.658	0.110	0.683	0.290	0.254	4	0.796	0	0.592	1
		NxL	0.084	0.056	0.442	0.051	0.979	0	0.658	0	0.820	0
		ExL	0.028	0.118	0.241	0.079	0.581	1	0.723	1	0.517	2
		NxL+ExL (c)	0.783	0.034	0.286	0.120	0.091	6	0.966	0	0.261	3
		NxL + ExL	0.819	0.023	0.223	0.026	0.989	0	0.718	0	0.844	0
III	GP25/In63 (=GP25/167)	NxL (c)	0.090	0.298	0.168	0.195	0.018	23	0.138	12	0.022	22
		NxL+ExL (c)	0.125	0.118	0.059	0.076	0.070	11	0.096	10	0.029	14
III	GP25/111	NxL (c)	0.083	0.259	0.215	0.228	0.896	0	0.713	0	0.906	0
		NxL+ExL (c)	0.054	0.975	0.595	0.652	0.385	2	0.949	0	0.593	1
IV	STM3016/frag	NxL (c)	0.529	0.058	0.138	0.104	0.228	5	0.450	2	0.261	4
		NxL	0.345	0.103	0.111	0.181	0.216	2	0.396	1	0.228	2
IV	BA9I23T7/227	NxL (c)	0.773	0.426	0.917	0.777	0.692	2	0.753	2	0.987	0
IV	BA9I23T7/230	NxL (c)	0.324	0.040	0.411	0.187	0.219	10	0.682	3	0.659	3
IV	BA70B11T7/334	NxL (c)	0.111	0.605	0.179	0.410	0.462	2	0.738	0	0.537	1
		ExL+NxL	0.271	0.869	0.527	0.825	0.838	0	0.671	0	0.929	0
V	BA47F2T3/356	NxL (c)	0.052	0.074	0.055	0.054	0.442	5	0.412	6	0.356	6
V	BA47F2T3/557	NxL (c)	0.854	0.849	0.759	0.787	0.978	0	0.999	0	0.993	0
V	BA76O11T3/286	NxL (c)	0.201	0.130	0.043	0.046	0.006	34	0.108	18	0.009	32
		NxL	0.156	0.249	0.062	0.124	0.012	12	0.126	7	0.035	10
		ExL	0.807	0.568	0.979	0.694	0.615	0	0.510	1	0.933	0
		NxL + ExL	0.492	0.143	0.062	0.066	0.912	0	0.157	1	0.419	0
V	BA76O11T3/310	NxL (c)	0.062	0.041	0.008	0.009	0.001	37	0.026	21	0.001	36
		NxL	0.149	0.032	0.041	0.040	0.006	11	0.227	3	0.019	9
V	BA76O11T7/144	NxL (c)	0.086	0.042	0.034	0.023	0.183	5	0.106	8	0.096	8
		NxL+ExL (c)	0.006	0.155	0.093	0.045	0.407	1	0.298	2	0.274	3
V	BA76O11T7/178	NxL (c)	0.008	0.001	0.000	0.000	0.000	40	0.001	33	0.000	48
		NxL+ExL (c)	0.004	0.083	0.005	0.004	0.029	11	0.012	14	0.004	18
V	BA76O11T7/186	NxL (c)	0.002	0.003	0.000	0.000	0.002	26	0.005	22	0.001	30
		NxL	0.109	0.004	0.031	0.030	0.005	8	0.102	3	0.010	7
		ExL	0.117	0.079	0.011	0.009	0.268	2	0.057	5	0.085	4
		NxL+ExL (c)	0.002	0.088	0.005	0.006	0.027	10	0.022	11	0.007	14
		NxL + ExL	0.875	0.317	0.782	0.695	0.229	1	0.712	0	0.323	1
V	BA87D17T3/109	NxL (c)	0.001	0.003	0.001	0.001	0.014	31	0.068	22	0.011	32

Fortsetzung Tab. 9-12: Ergebnisse der Korrelationsanalysen zur Identifizierung von QTLs.

LG	Locus/Marker	Population	Reife MW	Resistenz (AUDPC)			Resistenz ohne Reifeinfluss					
				2000	2001	MW	2000	R <sup>2</sup>	2001	R <sup>2</sup>	MW	R <sup>2</sup>
V	BA87D17T3/109	NxL	0.000	0.000	0.000	0.000	0.006	14	0.001	18	0.000	20
		ExL	0.513	0.765	0.671	0.801	0.930	0	0.404	1	0.654	0
		NxL	0.000	0.000	0.000	0.000	0.006	14	0.001	18	0.000	20
		ExL	0.513	0.765	0.671	0.801	0.930	0	0.404	1	0.654	0
V	BA87D17T3/146	NxL (c)	0.019	0.073	0.157	0.030	0.819	0	0.849	0	0.812	0
		NxL+ExL (c)	0.000	0.030	0.036	0.003	0.638	0	0.560	1	0.538	1
V	BA87D17T3/433	NxL (c)	0.236	0.136	0.367	0.118	0.156	6	0.412	2	0.199	5
V	BA121O1T7/289	NxL (c)	0.864	0.624	0.424	0.769	0.952	3	0.348	15	0.670	8
V	BA129O7T7/247 (=BA132H9T3/157)	NxL (c)	0.015	0.017	0.001	0.002	0.006	21	0.004	23	0.001	28
		NxL	0.109	0.001	0.031	0.014	0.006	8	0.177	2	0.017	6
		ExL	0.258	0.114	0.060	0.050	0.512	1	0.198	2	0.275	2
		NxL+ExL (c)	0.009	0.212	0.012	0.021	0.054	8	0.020	11	0.012	13
V	BA132H9T3/317	NxL + ExL	0.758	0.097	0.425	0.235	0.146	1	0.671	0	0.237	1
		NxL (c)	0.003	0.002	0.000	0.002	0.002	33	0.036	19	0.004	31
		NxL	0.002	0.001	0.002	0.003	0.002	14	0.096	5	0.004	12
		ExL	0.525	0.376	0.845	0.457	0.715	1	0.647	1	0.668	1
V	BA213C14T3/268 (=BA213C14T3/286)	NxL+ExL (c)	0.004	0.011	0.004	0.001	0.002	24	0.018	16	0.001	26
		NxL + ExL	0.014	0.039	0.027	0.043	0.141	2	0.142	2	0.065	3
		NxL (c)	0.005	0.002	0.002	0.000	0.267	4	0.032	14	0.071	10
		NxL	0.000	0.000	0.000	0.000	0.235	3	0.000	16	0.006	11
V	BA213C14T7/139	ExL	0.300	0.269	0.259	0.322	0.416	1	0.157	3	0.204	2
		NxL+ExL (c)	0.000	0.014	0.000	0.000	0.283	2	0.005	16	0.030	10
		NxL + ExL	0.000	0.010	0.000	0.000	0.200	2	0.000	9	0.005	6
		NxL (c)	0.243	0.143	0.383	0.123	0.156	6	0.412	2	0.199	5
V	BA213C14T7/253	NxL (c)	0.016	0.002	0.008	0.001	0.048	12	0.116	8	0.042	12
		NxL	0.000	0.000	0.000	0.000	0.049	6	0.009	10	0.007	11
		ExL	0.047	0.023	0.009	0.008	0.218	4	0.081	6	0.081	6
		NxL + ExL	0.077	0.241	0.176	0.167	0.094	2	0.221	1	0.081	2
V	BA213C14T7/273 (=BA213C14T7/452)	NxL (c)	0.008	0.002	0.008	0.001	0.092	9	0.088	9	0.054	11
		NxL	0.000	0.000	0.000	0.000	0.073	6	0.006	11	0.007	10
		ExL	0.332	0.243	0.237	0.254	0.034	9	0.503	2	0.108	6
		NxL + ExL	0.223	0.938	0.409	0.895	0.162	1	0.391	0	0.170	1
V	BA213C14T7/DFLP	NxL (c)	0.500	0.277	0.299	0.143	0.156	6	0.412	2	0.199	5
		NxL+ExL (c)	0.295	0.002	0.020	0.001	0.012	13	0.094	6	0.011	13
VI	BA34J14T7/302	NxL (c)	0.085	0.324	0.051	0.100	0.953	0	0.276	8	0.592	3
		NxL+ExL (c)	0.026	0.161	0.022	0.039	0.637	4	0.288	8	0.416	6
VI	BA34J14T7/374	NxL (c)	0.109	0.767	0.102	0.291	0.603	6	0.001	41	0.065	22
VI	BA1M23T3/28	NxL (c)	0.002	0.001	0.000	0.001	0.002	33	0.074	15	0.004	30
VI	BA1M23T3/90	NxL (c)	0.552	0.066	0.237	0.175	0.003	32	0.342	7	0.022	22
VII	BA228G19T7/23	NxL (c)	0.632	0.694	0.431	0.594	0.915	1	0.398	6	0.643	3
		NxL+ExL (c)	0.406	0.572	0.504	0.779	0.970	0	0.184	7	0.683	2
VII	BA228G19T7/70	NxL (c)	0.607	0.019	0.256	0.128	0.003	24	0.579	1	0.045	12
		NxL	0.945	0.131	0.536	0.223	0.026	5	0.801	0	0.145	2
		ExL	0.329	0.186	0.366	0.221	0.891	0	0.582	1	0.718	1
		NxL + ExL	0.369	0.158	0.780	0.372	0.109	2	0.860	0	0.250	1
VIII	BA73E8T3/39	NxL (c)	0.198	0.374	0.543	0.373	0.690	5	0.245	13	0.389	9
		NxL+ExL (c)	0.214	0.151	0.260	0.156	0.393	6	0.709	3	0.450	6
VIII	BA7E8T3/65	NxL (c)	0.571	0.894	0.400	0.627	0.621	3	0.049	18	0.185	10
		NxL+ExL (c)	0.342	0.001	0.031	0.011	0.006	20	0.028	14	0.004	22
VIII	BA261B9T7/174	NxL (c)	0.404	0.957	0.949	0.910	0.274	8	0.412	6	0.310	7
		NxL+ExL (c)	0.291	0.161	0.366	0.270	0.753	1	0.858	1	0.961	0
IX	CP135/187	NxL (c)	0.198	0.685	0.768	0.901	0.591	3	0.732	2	0.721	2
		NxL+ExL (c)	0.041	0.165	0.587	0.391	0.984	0	0.909	0	0.985	0

Fortsetzung Tab. 9-12: Ergebnisse der Korrelationsanalysen zur Identifizierung von QTLs.

LG	Locus/Marker	Population	Reife MW	Resistenz (AUDPC)			Resistenz ohne Reifeinfluss					
				2000	2001	MW	2000	R <sup>2</sup>	2001	R <sup>2</sup>	MW	R <sup>2</sup>
IX	S1D11/183	NxL (c)	0.248	0.501	0.458	0.551	0.599	6	0.958	1	0.786	3
IX	S1D11/186	NxL (c)	0.209	0.930	0.701	0.868	0.835	3	0.237	13	0.470	8
X	BA44A10T7/54	NxL (c)	0.569	0.110	0.231	0.112	0.056	11	0.378	2	0.108	8
		NxL+ExL (c)	0.179	0.294	0.457	0.224	0.212	3	0.889	0	0.374	2
X	BA44A10T7/114	NxL (c)	0.726	0.632	0.564	0.407	0.244	13	0.290	12	0.167	15
X	BA44A10T7/174	NxL (c)	0.513	0.663	0.913	0.773	0.924	1	0.519	4	0.924	1
X	BA63O3T7/228	NxL (c)	0.020	0.020	0.088	0.022	0.090	9	0.872	0	0.278	4
		NxL	0.208	0.045	0.036	0.024	0.056	4	0.179	2	0.059	4
X	BA63O3T7/328	NxL (c)	0.603	0.138	0.211	0.152	0.046	18	0.122	13	0.078	15
		NxL+ExL (c)	0.716	0.361	0.724	0.600	0.135	8	0.575	2	0.409	4
X	BA66K2T3/98	NxL (c)	0.411	0.919	0.639	0.907	0.617	3	0.922	1	0.911	1
		NxL+ExL (c)	0.366	0.623	0.759	0.891	0.291	5	0.983	0	0.650	2
X	BA66K2T3/212	NxL (c)	0.537	0.397	0.732	0.706	0.615	1	0.588	1	0.991	0
		NxL+ExL (c)	0.692	0.544	0.808	0.960	0.508	1	0.269	3	0.887	0
X	BA81L15T3/93	NxL (c)	0.371	0.223	0.253	0.174	0.920	1	0.572	4	0.723	2
		NxL+ExL (c)	0.437	0.811	0.682	0.933	0.650	2	0.767	1	0.975	0
X	BA81L15T3/193	NxL (c)	0.760	0.326	1.000	0.658	0.480	2	0.366	3	0.953	0
		NxL+ExL (c)	0.801	0.992	0.546	0.740	0.632	0	0.296	2	0.817	0
X	BA113A17T3/200	NxL (c)	0.037	0.226	0.206	0.247	0.943	1	0.188	15	0.800	3
X	BA113A17T3/200	NxL	0.902	0.532	0.107	0.229	0.682	2	0.029	10	0.309	4
		ExL	0.031	0.213	0.833	0.896	0.368	10	0.033	19	0.461	9
X	CP105/144	NxL (c)	0.782	0.867	0.591	0.692	0.921	5	0.320	18	0.814	7
X	GP266/158	NxL (c)	0.290	0.483	0.231	0.341	0.678	1	0.420	2	0.498	1
		NxL+ExL (c)	0.106	0.028	0.045	0.026	0.094	6	0.184	4	0.071	7
XI	BA228D23T3/111	NxL (c)	0.979	0.738	0.518	0.546	0.444	5	0.297	8	0.288	8
		NxL+ExL (c)	0.482	0.610	0.683	0.982	0.628	2	0.198	7	0.346	5
XI	BA228D23T3/142	NxL (c)	0.655	0.339	0.420	0.374	0.289	12	0.247	13	0.193	14
XI	BA228D23T3/174	NxL (c)	0.979	0.738	0.518	0.546	0.444	5	0.297	8	0.288	8
		NxL+ExL (c)	0.482	0.610	0.683	0.982	0.628	2	0.198	7	0.346	5
XI	NL27/335	NxL (c)	0.939	0.415	0.822	0.707	0.408	6	0.848	1	0.591	3
		NxL	0.502	0.741	0.739	0.932	0.446	2	0.884	0	0.805	0
		ExL	0.995	0.944	0.550	0.726	0.691	0	0.572	0	0.575	0
		NxL + ExL	0.415	0.090	0.907	0.191	0.438	0	0.922	0	0.656	0
XI	NL27/417	NxL (c)	0.434	0.238	0.986	0.334	0.570	1	0.723	0	0.880	0
		NxL+ExL (c)	0.297	0.337	0.616	0.242	0.625	1	0.843	0	0.846	0
XI	NL27/417	NxL	0.697	0.659	0.880	0.367	0.161	2	0.418	1	0.198	2
		ExL	0.067	0.306	0.273	0.409	0.844	0	0.877	0	0.828	0
		NxL + ExL	0.131	0.934	0.883	0.741	0.340	1	0.541	0	0.348	1
XII	BA106H21T3/74	NxL (c)	0.158	0.129	0.105	0.158	0.599	1	0.284	4	0.140	16
		NxL+ExL (c)	0.088	0.016	0.016	0.021	0.121	5	0.189	4	0.087	7

## 9.2. SNP-Dokumentationen und Sequenzen

Alle identifizierten SNP und Indels SNP-Dokumentationen und dazugehörige Sequenzen (BAC-Endsequenzen und Markersequenzen) sind in einer Datenbank des Deutschen Ressourcenzentrums für Genomforschung GmbH (Berlin) dokumentiert und dort abrufbar (<http://gabi.rzpd.de> → *Database* auswählen → *Greencards* auswählen).

### 9.3. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von den unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Dr. PD Christiane Gebhardt (Abteilung Pflanzenzüchtung und Ertragsphysiologie, Prof. Dr. Francesco Salamini, Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung) betreut worden.

Ich versichere, dass ich alle Angaben wahrheitsgemäß nach bestem Wissen und Gewissen gemacht habe und verpflichte mich, jedmögliche, die obigen Angaben betreffenden Veränderungen dem Dekanat unverzüglich mitzuteilen.

Köln, den 8. Oktober 2002



## 9.4. Veröffentlichungen aus dieser Arbeit

Teile dieser vorliegenden Arbeit sind bisher in folgenden Veröffentlichungen enthalten:

### Originalveröffentlichungen:

Rickert, A. M., Premstaller, A., Gebhardt, C., Oefner, P. J. (2002): Genotyping of SNPs in a polyploid genome by pyrosequencing. *Biotechniques*, 32(3):592-593, 596-598, 600

Premstaller, A., Oberacher, H., Rickert, A., Huber, C.G., Oefner, P.J. (2002): Multiplex analysis of single-nucleotide extension products on a 16-capillary, denaturing, high-performance liquid chromatography array. *Genomics*, 79(6): 793-798

### Podiumspräsentationen:

Rickert, A.M., Premstaller, A., Gebhardt, C., Oefner, P.J.: Quantitative Analysis of Single Nucleotide Polymorphisms in Tetraploid Potatoes. 9th conference of the AG Molecular Markers, Halle, 25.-26. September 2001

### Posterpräsentationen:

Rickert, A.M., Premstaller, A., Gebhardt, C., Oefner, P.J.: Analysis of single nucleotide polymorphisms in tetraploid potatoes by pyrosequencing and by primer extension + DHPLC. 9th conference of the AG Molecular Markers, Halle, 25.-26. September 2001

Rickert, A.M., Premstaller, A., Gebhardt, C., Oefner, P.J.: Genotyping of SNPs in polyploid organisms. Department of Biochemistry Research Conference, Fallen Leaf Lake, CA, USA, 25.-28. Oktober 2001

Ballvora, A., Rickert, A.M., Gebhardt, C.: Identification and characterization of genes controlling quantitative agronomic characters in potato by a candidate gene approach. GABI status meeting, Bonn, 18.-19. Februar 2002

Premstaller, A., Huebner, C., Rickert, A., Xiao, W., Oberacher, H., Huber, C., Oefner, P.: High throughput chromatographic arrays: Parallel HPLC and fluorescence detection. Stanford Genome Technology Center Offsite Conference, Palo Alto, CA, USA, 29.-30. April 2002

## 9.5. Danksagung

Am MPIZ möchte ich Prof. Dr. F. Salamini für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in seiner Abteilung danken.

Frau Dr. PD Ch. Gebhardt danke ich ganz herzlich für eine hervorragende Betreuung der Arbeit und dafür, dass sie mich meinen eigenen Weg im Laufe der Arbeit gehen ließ.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Agim Ballvora, der mit seiner Geduld und Hilfsbereitschaft zum Gelingen des Projektes beigetragen hat.

Dr. Ralf Schäfer-Pregel und Christina Bormann bin ich für deren hilfreiche Unterstützungen bei den statistischen Auswertungen dankbar. Für eine sehr angenehme Arbeitsatmosphäre danke ich, neben den bereits Erwähnten, Jürgen Paal, Rosa Castillo, Andreas Heibges, Li Li, Amir Sattarzadeh, Birgit Walkemeier, Heike Henselewski, Tamara Rotshteyn, Iris Schmitz, Monique Winkler, Mara Ercolano, Jeong Hee Kim und allen anderen Kollegen der Abteilung Salamini.

At the SGTC I am especially grateful to Prof. Dr. Peter Oefner, for the financial support of my project, and for his excellent supervision and kindness.

He and all the other fellows at the center turned my stay into a fantastic experience. In particular I would like to say *thank you* to Andreas Premstaller, Tierney Wayne, Tina Noyes, Deniz Sengun, Michael Mindrinos, Monika Trebo, Kara Juneau, Paul Vavra, Lars Steinmetz, Curt Scharfe, and Claus Huebner.

Der Aufenthalt am SGTC wurde teilweise durch ein Stipendium der Studienstiftung des deutschen Volkes finanziert.

Für die Bereitstellung des Pflanzenmaterials danke ich herzlich Dr. Jens Lübeck (Saka-Ragis Pflanzenzucht GbR) und Herrn H. Hofferbert (Nordkartoffel Zuchtgesellschaft mbH).

Ulrich Matzner von der Firma Alpha Technology GmbH möchte ich für die sehr produktive Zusammenarbeit bei den Chip-basierten Genotypisierungsmethoden danken.

Dank aussprechen möchte ich Dr. Svenja Meyer und Axel Nagel vom Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH für die geduldige Zusammenarbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. D. Tautz bedanke ich mich für die Anfertigung eines Gutachtens und bei Herrn Prof. Dr. M. Hülskamp für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Und natürlich ein ganz fettes DANKE an Maike! 😊

## 9.6. Lebenslauf

**Name:** Andreas Marcus Rickert  
**Geburtsdatum:** 08.01.1974  
**Geburtsort:** Menden (Sauerland)  
**Staatsangehörigkeit:** deutsch  
**Familienstand:** ledig  
**Privatadresse:** Am Kapellenberg 6  
 58706 Menden  
 Telefon: ++49 (0)2373 10467  
 E-Mail: andreas@rickert.info



**Schulbildung:**  
 1980 – 1984: Josefgrundschule, Menden  
 1984 – 1993: Walburgisgymnasium, Menden  
 9. Juni 1993: allgemeine Hochschulreife

**Zivildienst:**  
 Nov. 1993 – Okt. 1994 /  
 Febr. 1995 – April 1995: Umweltamt der Stadt Menden

**Studium:**  
 Okt. 1994 – März 1997: Studium der Biologie an der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf  
 15. Okt. 1996: Vordiplom  
 April 1997 – Juni 1999: Studium der Biologie an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn  
 Dez. 1997 – März 1998: Studium an der University of California, Davis, USA  
 29. Juni 1999: Diplom der Biologie mit den Fächern Zoologie, Genetik und Chemie; Thema der Diplomarbeit: „Molekulare Untersuchungen zur Phylogenie der Odonata“,  
 Okt. 1999 – Nov. 2001: Promotion im Bereich Genetik zum Thema: „Entwicklung und Analyse von SNP-Markern (*single nucleotide polymorphisms*) in Pathogenresistenz-vermittelnden Regionen des Kartoffelgenoms“ an der Universität zu Köln, durchgeführt am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln und am Stanford Genome Technology Center, Palo Alto, Kalifornien, USA

**Stipendien:**  
 Febr. 1995 – Juni 1999: Stipendium der Studienstiftung des deutschen Volkes