

**Die Nutzung neuerer PCR-gestützter molekularer
Markertechniken zur Erstellung einer dicht besetzten
Kopplungskarte des Roggens (*Secale cereale* L.)**

Vom Fachbereich Gartenbau
der Universität Hannover
zur Erlangung
des akademischen Grades eines

Doktors der Gartenbauwissenschaften

- Dr. rer. hort. -

genehmigte
Dissertation

von

Dipl.-Ing. agr. Bernhard Saal
geboren am 4. April 1966 in Weilheim i. OB.

1998

Referent: Prof. Dr. G. Wricke

Korreferent: Prof. Dr. H.-J. Jacobsen

Tag der Promotion: 3.2.1998

Kurzfassung

Die Nutzung neuerer PCR-gestützter molekularer Markertechniken zur Erstellung einer dicht besetzten Kopplungskarte des Roggens (*Secale cereale* L.)

Für die Kartierung und Markierung von Majorgenen und Polygenen ist in vielen Fällen eine dicht besetzte Kopplungskarte erforderlich. Vordringliche Ziele der Roggenzüchtung, wie die vollständige Restauration der Pollenfertilität als Grundlage für die Züchtung von Hybridsorten und die Erzeugung doppelhaploider Linien, können mit Hilfe genetischer Marker schneller und effektiver bearbeitet werden.

Ziel dieser Arbeit war es, neue PCR-gestützte Markertechniken für die Erweiterung und Absättigung der am Institut entwickelten Genkarte zu nutzen. Im Mittelpunkt stand die Entwicklung von SSR-Markern (simple sequence repeats) und die Kartierung von AFLP-Markern (Amplified Fragment Length Polymorphisms).

Von 182 aus genomischen DNA-Bibliotheken isolierten Klonen, die SSRs enthielten, sind 74 sequenziert worden. 56,8 % der SSRs stellten perfekte Motive dar, von denen 62 % vom Typ $(GT/CA)_n$ waren und 38 % das $(CT/GA)_n$ -Motiv trugen. Von 57 entwickelten Primerpaaren erzeugten 27 spezifische Amplifikate im erwarteten Größenbereich. Zwölf dieser SSR-Marker wurden genetisch kartiert, 8 weitere sind mit Hilfe von disomen und ditelosomen Additionslinien Chromosomen oder Chromosomenarmen zugeordnet worden. Mit Ausnahme von Chromosom 4R sind alle Chromosomen mit mindestens 2 SSR-Markern besetzt. Der Polymorphiegrad von SSR-Markern war im Vergleich zu RFLP-, RAPD- und AFLP-Markern in der verwendeten Kartierungspopulation am höchsten. Zusätzlich konnte ein SSR-Marker des Weizens kartiert werden. Die Übertragbarkeit von SSR-Markern zwischen Arten der *Triticeae* gelingt aber nur in wenigen Fällen.

Im Rahmen der Kartierung von AFLP-Markern sind mit 18 *EcoRI/MseI*-Primerkombinationen etwa 1180 Banden analysiert worden, von denen 148 polymorph waren. Es wurden Polymorphiegrade zwischen 5,7 % und 33,3, % gefunden. Aus den 8 Primerkombinationen mit dem höchsten Polymorphiegrad gingen 80 polymorphe Loci hervor, von den 74 kartiert werden konnten. An einigen chromosomalen Regionen traten Cluster mit AFLP-Markern auf.

Nach Integration von Isoenzym- und RFLP-Markern anderer Populationen umfaßt die Kopplungskarte 226 Marker mit einer Gesamtlänge von etwa 1380 cM. Dies entspricht vermutlich einer Genomabdeckung von etwa 80 %. Die Karte enthält 2 morphologische Marker, 19 Isoenzym-, 88 RFLP-, 29 RAPD-, 14 SSR- und 74 AFLP-Marker. Daraus ergibt sich ein durchschnittlicher Markerabstand von 6,1 cM.

In den beiden Populationssorten 'Halo' und 'Danko' wurden Polymorphiegrade von RFLP-, SSR- und RAPD-Markern ermittelt. RFLP- und SSR-Marker wiesen mit 0,43 bzw. 0,61 einen höheren durchschnittlich zu erwartenden Heterozygotiegrad auf als RAPD-Marker (0,30). Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen SSR- und RFLP-Markern konnte nur in der Sorte 'Danko' nachgewiesen werden. Bei Fremdbefruchtungern wie Roggen liegt ein wesentlicher Vorteil von SSR-Markern gegenüber RFLPs in der einfachen und schnellen Analyse.

Abstract

The use of recent PCR-based molecular markers for the construction of a dense genetic linkage map of rye (*Secale cereale* L.)

In many cases the mapping of major genes and polygenes requires dense genetic linkage maps. Objectives in rye breeding, for example the complete restoration of pollen fertility in hybrids and the production of doubled haploid lines, can be accomplished in a faster and more efficient way by means of genetic markers.

The research work, documented in this thesis, has focussed on the use of recent polymerase chain reaction (PCR)-based molecular markers in order to extend and saturate a rye genetic map which has been previously developed at the Institute of Applied Genetics, University of Hannover. This was achieved by the development and mapping of rye-specific simple sequence repeat markers (SSRs, microsatellites) and Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLPs).

SSR markers were obtained by screening rye genomic libraries with (CT)₁₀ and (GT)₁₀ oligonucleotide probes, sequencing of positive clones and primer pair construction. 74 out of 182 clones which contained SSRs were sequenced. Perfect repeats were found in 56.8 % of these clones. 62 % of the perfect repeats represented the (GT/CA)_n motif, the remainder were (CT/GA)_n-SSRs. Construction of 57 primer pairs has resulted in 27 specific SSR markers with PCR products within the expected size range. Twelve SSR markers could be genetically mapped, 8 more markers were chromosomally localized by means of disomic and ditelosomic wheat-rye addition lines. With the exception of chromosome 4R any of the 7 rye chromosomes is covered with at least 2 SSR markers. Additionally, one previously described SSR marker of wheat could be mapped. However, the transferability of SSR markers between species of the *Triticeae* seems to be low. In the F₂ mapping population the polymorphic level of SSR markers was higher compared with RFLP, RAPD and AFLP markers.

In mapping studies with AFLP markers a total of 1180 bands resulting from 18 *EcoRI/MseI* primer combinations has been analyzed and 148 bands were found to be polymorphic in the mapping population. Polymorphic levels between primer combinations ranged from 5.7 % to 33.3 %. 80 polymorphic loci resulted from the 8 most polymorphic combinations and 74 of them could be integrated into the genetic map. Some chromosomal regions revealed clusters of AFLP markers.

Upon integration of isozyme and RFLP markers from other mapping populations the combined linkage map comprises 226 markers and has a total length of about 1380 cM which is assumed to be about 80 % of the whole rye genome. The map consists of 2 morphological markers, 19 isozymes, 88 RFLP, 29 RAPD, 14 SSR and 74 AFLP markers. This corresponds to an average marker distance of 6.1 cM.

Levels of polymorphisms of a subset of RFLP, RAPD and SSR markers have been evaluated in the open pollinated cultivars 'Halo' and 'Danko'. RFLP and SSR markers showed an average heterozygosity of 0.43 and 0.61, respectively, and were superior to RAPD markers (0.30). However, a statistically significant difference between SSR and RFLP markers could be only established for the cultivar 'Danko'. Therefore, the major advantage of SSR markers over RFLP markers in outcrossing crops such as rye lies in their easy and fast analysis.

Schlagworte: Roggen
Molekulare Marker
Genetische Karte

Keywords: rye
molecular markers
linkage map

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungen	
1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	6
2.1 Pflanzenmaterial	6
2.1.1 Erstellung und Erhaltung der F ₂ -Kartierungspopulation	6
2.1.2 Weizen-Roggen-Additionslinien	6
2.2 DNA-Marker	8
2.2.1 DNA-Isolierung	8
2.2.2 Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLPs)	9
2.2.2.1 Sonden für den Nachweis von RFLPs	9
2.2.2.2 Methodik zur Darstellung von RFLPs	10
2.2.3 Random Amplified Polymorphic DNAs (RAPDs)	13
2.2.3.1 Dekamer-Primer	13
2.2.3.2 Methodik zur Darstellung von RAPDs	14
2.2.4 Simple Sequence Repeats (SSRs, Mikrosatelliten)	14
2.2.4.1 Erstellung genomischer DNA-Bibliotheken	15
2.2.4.2 Sichtung der Bibliotheken mit synthetischen Oligonukleotiden	20
2.2.4.3 <i>in vivo</i> -Exzision	22
2.2.4.4 Sequenzierung	23
2.2.4.5 Konstruktion von Primerpaaren	24
2.2.4.6 PCR-Bedingungen	25
2.2.4.7 Elektrophoresebedingungen und Detektion	26
2.2.5 Amplifikationsfragment-Längenpolymorphismen (AFLPs)	27
2.2.5.1 Primerkombinationen	27
2.2.5.2 Restriktion und Ligation	28
2.2.5.3 Präselektive und selektive Amplifikation	29
2.2.5.4 Auftrennung und Detektion	31
2.3 Datenanalyse	31
2.3.1 Kopplungskarte	31
2.3.1.1 Spaltungsanalysen	31
2.3.1.2 Kopplungsanalysen und Kartenerstellung	32
2.3.2 Untersuchungen zum Polymorphiegrad molekularer Marker	34

2.3.2.1 Schätzung von Allelhäufigkeiten	34
2.3.2.2 Maßzahlen für die Variation von Markern	36
3. Ergebnisse	38
3.1 Molekulare Marker	38
3.1.1 RFLPs	38
3.1.2 RAPDs	40
3.1.3 Simple Sequence Repeats (SSRs)	41
3.1.4 AFLPs	53
3.2 Erstellung einer dicht besetzten Genkarte	57
3.2.1 Spaltungsanalysen	57
3.2.2 Kopplungsanalysen	62
3.2.3 Verbundene Kopplungskarten für die Chromosomen 5R und 6R	71
3.3 Untersuchungen zum Polymorphiegrad molekularer Marker	76
3.3.1 RFLPs	76
3.3.2 RAPDs	77
3.3.3 SSRs	78
3.3.4 Maßzahlen für den Polymorphiegrad molekularer Marker	81
4. Diskussion	83
4.1 Entwicklung von SSR-Markern bei Roggen	83
4.2 Kartierung von AFLP-Markern bei Roggen	90
4.3 Erstellung einer dicht besetzten Genkarte des Roggens	93
4.4 Maßzahlen für den Polymorphiegrad zur Bewertung von Markersystemen	103
5. Zusammenfassung	107
6. Literatur	109
7. Anhang	120

Abkürzungen

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
cfu	Colony forming units
CIAP	Calf Intestine Alkaline Phosphatase
cM	Centimorgan
DEAE	Diethylaminoethyl
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
F	Testgröße in der Varianzanalyse
h	Stunden
H ₂ O _{dd}	bidestilliertes Wasser
I _{0,1}	Selbstungsnachkommenschaft einer nicht ingezüchteten Pflanze
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
M	Molar
Mbp	Megabasenpaare
min	Minuten
N ₂ liqu.	flüssiger Stickstoff
P	Irrtumswahrscheinlichkeit
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
pfu	Plaque forming units
PIC	Polymorphic information content
PIPES	Piperazin-N,N'-bis[2-ethansulfonsäure]
PVP 400	Polyvinyl-Pyrrolidon MW=400000
QTL	Quantitative trait locus
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunden
SSC	Standard saline citrate
SSR	Simple sequence repeat
STS	Sequence Tagged Site
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
T _m	Schmelztemperatur der DNA
Tris	Tris[hydroxymethyl]aminomethan
Vol.	Volumen
xg	Zentrifugalbeschleunigung, ausgedrückt in g (9,8 ms ⁻²)
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-Indolyl-β-D-Galaktosid

1. Einleitung

Genetische Marker haben im Laufe der letzten beiden Jahrzehnte für die Genetik als solche, aber auch für die praktische Pflanzenzüchtung sehr an Bedeutung gewonnen (WEBER und WRICKE 1994). Ein genetischer Marker stellt einen Referenzpunkt mit eindeutigen Phänotyp dar, der einem bestimmten DNA-Abschnitt zugeordnet werden kann. Er ist durch einen genetischen Polymorphismus, das heißt durch das Auftreten von zwei oder mehr Typen, deren Häufigkeiten nicht durch rekurrente Mutationen erklärbar sind (WRICKE 1972), gekennzeichnet. Der Phänotyp kann auf unterschiedlichen Stufen erfaßt werden. Während morphologische Marker direkt an der Pflanze erkennbar sind, erfordern biochemische, cytologische und molekulare Marker für ihre Darstellung einen mehr oder weniger hohen labortechnischen Aufwand. In einem sehr hohen Maße haben molekulare Marker, auch DNA-Marker genannt, die genetische Forschung beeinflusst. Mit ihrer Hilfe können direkt auf der Ebene der DNA Mutationen nachgewiesen werden, die nicht an der Merkmalsausprägung beteiligt sein müssen. Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in Verbindung mit hitzestabilen DNA-Polymerasen hat zudem die Entwicklung PCR-gestützter Markersysteme vorangetrieben. Auf der Basis molekularer Marker war auch die Erstellung dicht besetzter Kopplungskarten möglich und damit die Voraussetzung geschaffen für die Markierung von Genen und deren Isolierung über das sogenannte „map-based cloning“.

Für die Selektion agronomisch wichtiger Eigenschaften können genetische Marker auch beim Kulturroggen (*Secale cereale* L.) eine wertvolle Hilfe leisten. Kurzfristig sind Verbesserungen der Antherenkultureignung sowie der Restorerfähigkeit für die Züchtung von Hybridsorten (DEIMLING *et al.* 1997, MIEDANER *et al.* 1997), mittelfristig aber vor allem die Auslese von Krankheitsresistenzen und Qualitätseigenschaften eine wesentliche Aufgabe der Züchtung bei Roggen. Die Züchtungsforschung muß daher die Voraussetzungen für eine effektive Selektion auf diesen Gebieten schaffen, welche in Verbindung mit dem Einsatz genetischer Marker erfolgreich sein kann. Ein grundlegender Schritt für die Verwendung von Markern besteht darin, möglichst das vollständige Genom mit Markern abzusättigen, das heißt, eine dicht besetzte Genkarte des Roggens anzustreben.

Bei einer Reihe wichtiger Kulturpflanzenarten konnten mit Hilfe von Isoenzym- und molekularen Markern bereits dicht besetzte Kopplungskarten erarbeitet werden (TANKSLEY *et al.* 1992, HEUN *et al.* 1991). Mit Ausnahme der Gerste besteht bei den europäischen Getreidearten noch ein Mangel an einer ausreichenden Anzahl an Markerloci. Für den Roggen existieren zur Zeit mehrere, voneinander unabhängige genetische Karten oder Karten einzelner Chromosomen (DEVOS *et al.* 1993b, PHILIPP *et al.* 1994, WANOUS und GUSTAFSON 1995, WANOUS *et al.* 1995, LOARCE *et al.* 1996, SENFT und WRICKE 1996, KORZUN *et al.* 1997).

Eine erste, auf **Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen** (RFLPs) basierende Chromosomenkarte des Roggens wurde von WANG *et al.* (1991) für Chromosom 1R vorgestellt. Weitere folgten für die Chromosomen 2R, 3R, 4R, 5R und 7R (DEVOS *et al.* 1992, 1993a, LIU *et al.* 1992, ROGNLI *et al.* 1992). Bei diesen Arbeiten erfolgte die Erstellung von Kopplungskarten unter Verwendung von genomischen und cDNA-Sonden des Weizens. Damit war es auch möglich, die Frage der Homöologiebeziehungen zwischen den beiden Getreidearten weiter aufzuklären. Eine Zusammenfassung dieser Untersuchungen und eine erste molekulare Karte des gesamten Roggengenoms, bestehend aus 9 biochemischen und 147 RFLP-Markern, lieferten DEVOS *et al.* (1993b), die auch eine Hypothese für die Evolution des Roggengenoms aus einem „Vorläufergenom“ der *Triticeae* vorstellen.

Die erste Genkarte des Roggens, die roggen-spezifische RFLP-Marker enthält, wurde von PHILIPP *et al.* (1994) veröffentlicht. Daneben wird zum ersten Mal der Einsatz von **Random Amplified Polymorphic DNA**-Markern (RAPDs) (WILLIAMS *et al.* 1990) für die Genkartierung beim Roggen beschrieben. Diese, am Institut für Angewandte Genetik der Universität Hannover erstellte, auf mehreren Inzuchtlinien basierende Kopplungskarte enthielt 60 Loci, darunter morphologische, physiologische, Isoenzym- sowie RFLP- und RAPD-Marker. SENFT und WRICKE (1996) erweiterten diese Genkarte unter Verwendung einer zusätzlichen F₂-Kartierungspopulation, aus der 92 Isoenzym-, RFLP- und RAPD-Marker hervorgingen. Eine auf sämtliche Kartierungspopulationen basierende Gesamtkarte beinhaltet über 127 Marker und umfaßt eine Gesamtlänge von etwa 760 cM (SENFT und WRICKE 1996). In dieser Karte sind auch Gene für wirtschaftlich wichtige Eigenschaften, namentlich ein dominantes Mehltreueresistenzgen *Pm* (WRICKE *et al.* 1996) und die beiden Inkompatibilitätsloci *S* und *Z* (WRICKE und WEHLING 1985, GERTZ und WRICKE 1989) berücksichtigt. Ein Teil der RFLP-Marker in der Karte geht auf Sonden von Weizen und Gerste zurück. Die Untersuchungen von SENFT und WRICKE (1996) zu RAPD-Markern schlossen auch ein modifiziertes Protokoll nach RIEDE *et al.* (1994) ein, jedoch war der Anteil kartierter Marker mit 7,9% weiterhin zu gering, um die Genkarte beträchtlich anzureichern. Einen ähnlich niedrigen Polymorphiegrad von RAPD-Markern ermittelten LOARCE *et al.* (1996), der in ihrem Material durchschnittlich 5,5% betrug. Ein Grund dafür, daß sich viele RAPD-Primer nicht für die Genkartierung bei Roggen eignen, beruht auf der eingeschränkten Reproduzierbarkeit, die möglicherweise auf die komplexe Genomstruktur des Roggens zurückzuführen ist. Zudem ist aufgrund der unspezifischen Anlagerung der Dekamer-Primer nicht immer davon auszugehen, daß PCR-Produkte ähnlicher Größe zueinander ortholog sind. Untersuchungen bei Weizen zeigen, daß die einmal ermittelten Amplifikationsbedingungen exakt eingehalten werden müssen, um zu gleichen Ergebnissen zu gelangen (DEVOS und GALE 1992). Diese Forderung ist

in der Praxis nicht immer gewährleistet. Insgesamt gesehen trugen RAPD-Marker bisher nur wenig zur Abdeckung des Roggengenoms mit molekularen Markern bei.

Ein neuer Beitrag zur Aufklärung der Beziehung zwischen genetischer und physikalischer Länge einzelner Roggenchromosomen wurde von WANOUS und GUSTAFSON (1995) sowie WANOUS *et al.* (1995) beigesteuert. So verwendeten die Autoren als Kreuzungseltern ihrer Kartierungspopulation Linien mit polymorphen terminalen C-Banding-Mustern und konnten damit die physikalischen Enden der Roggenchromosomen 1R, 6R und 7R zusammen mit homologen und homöologen RFLP-Markern genetisch kartieren. Die Einbeziehung solcher cytologischer Marker führte jedoch zu einem drastischen Anstieg der genetischen Gesamtlänge dieser Chromosomen, welcher zuvor in anderen Untersuchungen nicht beobachtet wurde. Es konnte nicht geklärt werden, ob Umwelteinflüsse oder genotypische Unterschiede in den Kreuzungseltern dafür verantwortlich sind oder Regionen mit bisher nicht aufgedeckter Rekombination diesen Befund erklären. Die zuletzt genannte Hypothese hätte zur Folge, daß sehr viel mehr Marker zur Abdeckung des Roggengenoms nötig sein würden.

Wie bereits bei WANOUS und GUSTAFSON (1995) und WANOUS *et al.* (1995) kamen für die RFLP-Kartierung bei LOARCE *et al.* (1996) neben genomischen und cDNA-Sonden von Weizen, Gerste und Hafer auch genomische Roggensonden zum Einsatz. Diese zeigten im Vergleich zu den heterologen Sonden einen deutlich höheren Polymorphismus (65,6%). Die Untersuchungen von SENFT und WRICKE (1996) konnten diese Beobachtung nicht bestätigen. Hier zeigten alle Sonden mit im Durchschnitt etwa 36% einen erstaunlich niedrigen Polymorphiegrad. Es sind aber in diesen Untersuchungen nur vier statt sechs Restriktionsenzyme verwendet worden. Allerdings kann dieser Umstand allein nicht die große Differenz erklären. Vielmehr scheint die dort verwendete Kartierungspopulation über einen geringeren Anteil spaltender Loci zu verfügen.

Eine erst vor kurzem vorgestellte Genkarte des Roggens von KORZUN *et al.* (1997) basiert auf 88 RFLPs, 2 morphologische Marker und einem Isoenzym. Auch hier war der Polymorphiegrad insbesondere von RFLP-Sonden des Roggens und Weizens (75% bzw. 66%) mit durchschnittlich 59 % höher als bei SENFT und WRICKE (1996). Die Koppelungskarte resultiert aus zwei Karten, die für reziproke F₂-Nachkommenschaften erstellt wurden. Mit Ausnahme einiger Regionen auf den Chromosomen 1R, 3R und 5R konnte insgesamt eine gute Übereinstimmung der Markerreihenfolgen und -abstände festgestellt werden, so daß die Konstruktion einer einzigen Karte aus den beiden einzelnen keine größeren Probleme bereitete.

Würde man die Ergebnisse aller eben genannten Arbeiten zusammenfassen, so könnte derzeit das Genom des Roggens mit 250 bis 300 Markern kartiert werden. Insgesamt sind bisher mehr als 720 im Roggen kartierte Gen- und Markerloci bekannt (SCHLEGEL und

MELZ 1996). Allerdings steht bis heute keine Referenzpopulation zur Verfügung, mit der sich eine einzige, dicht besetzte Kopplungskarte erzeugen ließe.

Mit einer solchen Karte sollte für jedes agronomisch wichtige Merkmal ein eng gekoppelter Marker oder ein Markerintervall zur Verfügung stehen. Außerdem kann eine Auswahl von Markern, die nahezu das ganze Genom abdecken, für Rückkreuzungsprogramme von Nutzen sein.

Die Anwendbarkeit eines Markers in einem Zuchtprogramm ist aber auch vom Aufwand für seine Analyse abhängig. Die Kosten für die Durchführung einer RFLP-Analyse sind nach wie vor sehr groß und verhindern häufig die Einführung dieser Methodik in das Züchterlabor. Hingegen kann mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) bereits mit geringen DNA-Mengen in relativ kurzer Zeit eine Reihe von Markern analysiert werden. Solche Marker sind auch einer Automatisierung leichter zugänglich. Neben den RAPD-Markern zählen dazu die in jüngster Zeit an Bedeutung gewinnenden simple sequence repeats (SSRs), auch Mikrosatelliten-Marker genannt, und Amplifikationsfragment-Längenpolymorphismen (AFLPs) (VOS *et al.* 1995). Ein routinemäßiger Einsatz von RAPDs scheint, wie bereits weiter oben beschrieben, bei nahezu allen europäischen Getreidearten aufgrund der nicht immer gegebenen Reproduzierbarkeit an seine Grenzen zu stoßen. Die Nutzung von spezifischen Primern, die im Falle von SSRs und AFLPs gegeben ist, umgeht dieses Problem. Bei SSRs handelt es sich um einfache Sequenzmotive einer Länge von einem bis wenige Basenpaare (bp), die sich viele Male hintereinander anordnen, was als tandemrepetitiv bezeichnet wird. Es handelt es sich bei SSRs um ein hoch informatives, multialleles System, das durch die unterschiedliche Anzahl der aufeinanderfolgender Wiederholungseinheiten charakterisiert ist. Während die Primerpaare für einen SSR relativ spezifisch sind und daher nur einen oder wenige Loci amplifizieren, handelt es sich bei den AFLPs um eine Fingerprint-Technik, bei der ein komplexes Bandenmuster erzeugt wird, welches durch selektive Amplifikation von bestimmten Restriktionsfragmenten entsteht. Da sich in der Regel die zwei zu einem Locus gehörenden Banden selten auffinden lassen, werden einzelne, mit Null-Allel spaltende polymorphe Banden ausgewertet, die dann einem dominanten Erbgang folgen. Mit der AFLP-Technik läßt sich bei einem Pflanzenmaterial mit einem entsprechenden Polymorphiegrad in relativ kurzer Zeit eine große Anzahl an Markern gewinnen, die auch zur Feinkartierung von Genen eingesetzt werden können (MEKSEM *et al.* 1995). Die Entwicklung von SSR-Markern ist langwierig und teuer, denn sie setzt die Klonierung und Isolierung der entsprechenden Zielsequenzen einschließlich der benachbarten Regionen voraus. Außerdem muß für jeden Locus ein eigenes Primerpaar entworfen werden.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation ist es gelungen, weitere RFLP- und RAPD-Marker zu integrieren. Die oben beschriebenen Schwierigkeiten bei RAPD-Markern und

die Nachteile der RFLP-Analyse führten aber dazu, daß das Schwergewicht auf die Erzeugung von SSR-Markern gelegt wurde. Im letzten Abschnitt der Arbeiten konnten auch AFLP-Marker in die Karte eingefügt werden (SAAL und WRICKE 1997). Die am Institut für Angewandte Genetik entwickelte Genkarte wurde erheblich angereichert und umfaßt nun 226 Marker mit einer Gesamtlänge von etwa 1380 cM. Außerdem ist von einigen RFLPs, RAPDs und SSR-Markern des Roggens der Polymorphiegrad in den Populationssorten `Halo´ und `Danko´ erfaßt worden.