

Charakterisierung von zwei monogenen Mutanten der Erbse, *Pisum sativum* L., mittels molekularbiologischer Arbeitsmethoden

Vom Fachbereich Biologie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.
genehmigte Dissertation

von
Dipl.-Biol. Mark von Stackelberg
geboren am 22.09.1966 in Hannover

2003

Referent : Prof. Dr. H.-J. Jacobsen
Korreferent : Prof. Dr. U. Schmitz
Tag der Promotion : 28. Januar 2003

Es gibt ein Ding zwischen den
Mundwinkeln, das heißt das Durchbeißen.

chinesisches Sprichwort

zitiert nach Fritz Mühlenweg (1950)

In geheimer Mission durch die Wüste Gobi

Abstract

The initiation of flowering as a key event in plant development was investigated by means of an early flowering mutant of pea (*Pisum sativum* L.). The *Late Flowering* gene as the central flowering repressor with a threshold function plays a major role in pea flower initiation. The recessive mutation *lfa* of the *Late flowering*-gene leads to an extreme early flower initiation in contrast to the late flowering wildtype. Wildtype 'DGV' and mutant '46A' were grown in parallel until the mutant flowering was initiated. At this point expression patterns of wildtype and mutant shoot-apices were screened for differentially expressed transcripts initially with two different variations of Differential Display-PCR. More than 17000 PCR bandings have been analysed without detection of differential patterns. In an additional approach the Suppression Subtractive Hybridization was used in two independent trials for the analysis of expression patterns. The enrichment for differential transcripts in the subtracted libraries could not be proved via hybridization-, sequence- or database analysis. The constant absence of differential transcripts in the various methods leads to the assumption, that flowering is initiated by expression changes in rare transcripts and furthermore to a questioning of the sensitivity for low abundance mRNAs of the applied methods.

The recessive mutation of the *def* gene of pea leads to the loss of the hilum, the abscission zone between the seed and the pod. Thereby, it reduces the free dispersal of the seeds through pod shatter. As a prerequisite for a gene isolation via a map-based cloning approach, bulked segregant analysis followed by single plant analyses of over 200 homozygous individuals of a population of 476 F₂ plants derived from a cross between 'DGV' (*def* wildtype) and 'PF' (*def* mutant) were used to detect markers closely linked to the *def* locus. The AFLP technique in combination with silver staining was used to maximize numbers of reproducible marker loci. 15 AFLP loci showed a genetic distance less than 5 and two of them less than 1 centiMorgan (cM) to the gene of interest. AFLPs were converted into sequence tagged sites (STS) and into a newly refined AFLP based single locus marker named 'sequence specified AFLP' (ssAFLP).

Keywords: pea, *Lf*, *def*, Differential Display, SSH, AFLP, STS;

Zusammenfassung

Die Initiation der Blüte als ein Schlüsselereignis der Pflanzenentwicklung wurde mit Hilfe einer frühblühenden Mutante der Erbse (*Pisum sativum* L.) untersucht. Das *Late Flowering*-Gen als der zentrale Blührepressor mit einer Schwellenwert-Funktion hat eine hervorgehobene Bedeutung beim Blühbeginn der Erbse. Die rezessive Mutation *lfa* des *Late Flowering*-Gens führt im Gegensatz zum spätblühenden Wildtyp zu einer extrem verfrühten Blüteninitiation. Wildtyp "DGV" und Mutante "46A" wurden parallel angezogen, bis bei der Mutante die Blüte initiiert wurde. An diesem Punkt wurden die Expressionsmuster von Spross-Apices des Wildtyps und der Mutante mittels zweier Varianten der "Differential Display-PCR" verglichen. Mehr als 17000 PCR-Banden wurden analysiert, ohne differentielle Bandenmuster detektieren zu können. In einem weiteren Ansatz wurde die "Suppression Subtractive Hybridization" (SSH) in zwei unabhängigen Durchgängen zur Analyse der Expressionsmuster verwendet. Eine Anreicherung für differentiell exprimierte Transkripte in den subtrahierten cDNA-Banken konnte durch Hybridisierungs-, Sequenz- und Datenbank-Analysen nicht bestätigt werden. Das durchgängige Fehlen differentieller Transkripte in den verschiedenen angewendeten Methoden führt zu der Annahme, dass die Blüte durch Änderungen der Expression seltener Transkripte initiiert wird, und dass die angewendeten Methoden nur eine limitierte Sensitivität besitzen, solche seltenen mRNAs detektieren zu können.

Die rezessive Mutation des *Development of Funiculus*-Gens (*def*) der Erbse führt zum Verlust des Hilums, der Abscissionszone zwischen Samen und Hülse. Hierdurch wird das freie Ausstreuen der Samen reduziert. Als Voraussetzung für eine Gen-Isolation über eine kartengestützte Klonierung wurde eine "Bulked Segregant Analysis" gefolgt von einer Einzelpflanzen-Analyse von über 200 homozygoten Individuen aus 476 F₂-Pflanzen einer Kreuzung von "DGV" (*def*-Wildtyp) mit "PF" (*def*-Mutante) durchgeführt, um eng mit dem *def*-Locus gekoppelte Marker zu identifizieren. Für eine maximale Anzahl reproduzierbarer Marker-Loci wurde die AFLP-Technik in Kombination mit Silberfärbung verwendet. 15 AFLP-Loci liegen genetisch weniger als 5 und zwei weniger als 1 centiMorgan vom Genort entfernt. AFLPs wurden in "Sequence Tagged Sites" (STS) und daneben in einen neu verfeinerten AFLP-basierten Einzellocus-Marker mit Namen "sequence specified AFLP" (ssAFLP) konvertiert.

Schlagwörter: Erbse, *Lf*, *def*, Differential Display, SSH, AFLP, STS;

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Der <i>Late Flowering</i> -Locus	1
1.1.1 Konzept für eine Charakterisierung der Blüteninitiation	4
1.2 Der <i>Development Funiculus</i> -Locus	6
1.2.1 Konzept für eine Charakterisierung des <i>def</i> -Gens	9
2. Material und Methoden	11
2.1 Arbeiten mit Bakterien	11
2.1.1 Herstellung von transformationskompetenten Bakterien	11
2.1.2 Transformation von Bakterien	12
2.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	13
2.2 Pflanzen	13
2.2.1 Pflanzen für die Analyse des <i>Late Flowering</i> -Gens	13
2.2.2 Pflanzen für die Analyse des <i>Development Funiculus</i> -Gens	14
2.3 DNA-Isolierung aus Pflanzenmaterial	14
2.4 RNA-Isolierung aus Pflanzenmaterial	16
2.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	16
2.5.1 Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung von DNA	16
2.5.2 Konzentrationsbestimmung von DNA mittels Fluorimeter	16
2.5.3 Konzentrationsbestimmung von RNA	17
2.6 Agarosegelelektrophorese	17
2.6.1 DNA-Agarosegelelektrophorese	17
2.6.2 DNA-Isolierung aus Agarosegel	18
2.6.3 RNA-Agarosegelelektrophorese	18
2.7 Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese	19
2.8 Silber-Färbung von DNA in Polyacrylamid-Gelen	20
2.9 AFLP-Analyse	21
2.9.1 Restriktionsverdau	21
2.9.2 Adapter-Ligation	22
2.9.3 Preamplifikation	22
2.9.4 Selektive Amplifikation	22
2.9.5 Elektrophorese und Färbung der AFLP-Banden-Profile	23
2.10 Umwandlung von AFLP-Markern in sequenzspezifische Marker	23

2.10.1	Umwandlung in Sequence Tagged Sites (STS)	23
2.10.2	Umwandlung in sequenzspezifizierte AFLP-Marker (ssAFLP)	24
2.11	Erstellung einer Kopplungskarte des <i>def</i> -Locus	24
2.11.1	Nomenklatur der Loci	24
2.11.2	Vererbung der Loci	25
2.11.3	Bulked Segregant Analysis	25
2.11.4	Einzelpflanzen-Analyse	26
2.11.5	Zweipunkt-Rekombinationsfrequenz-Analyse	27
2.11.6	Erstellung von Kopplungskarten	27
2.12	Differential Display Reverse Transkription PCR	28
2.12.1	Reverse Transkription	28
2.12.2	Amplifikation	29
2.12.3	Elektrophorese und Färbung der DDRT-PCR-Banden-Profile	29
2.13	Enhanced Differential Display	29
2.13.1	Reverse Transkription	30
2.13.2	Amplifikation	30
2.13.3	Elektrophorese und Färbung der EDD-PCR-Banden-Profile	30
2.14	Suppression Subtractive Hybridization	31
2.14.1	SMART-PCR-cDNA Synthese und Amplifikation	31
2.14.2	Reverse Transkription	31
2.14.3	Long-Distance-PCR	32
2.14.4	<i>Rsa</i> I Verdau	32
2.14.5	Adapter-Ligation	33
2.14.6	Hybridisierung I	33
2.14.7	Hybridisierung II	33
2.14.8	PCR I	34
2.14.9	Nested-PCR	34
2.14.10	Klonierung der SSH	34
2.15	Hybridisierungen zur Überprüfung differentieller Expression	35
2.15.1	PCR der cDNA Klone	35
2.15.2	Reverse Dot Blot	36
2.15.2.a	Hybridisierung	36
2.15.3	Reverse Virtual Northern Blot	36
2.15.3.a	Hybridisierung	37

2.15.4	Herstellung der cDNA-Sonden mittels Zufallsprimer-Markierung	37
2.15.4.a	Abschätzung der Markierungseffizienz	37
2.15.5	Virtual Northern Blot	38
2.15.5.a	Herstellung von Kandidaten-cDNA-Klon-Sonden mittels PCR-Markierung	38
2.15.5.b	Abschätzung der Markierungseffizienz	39
2.15.5.c	Aufreinigung der markierten DNA	39
2.15.5.d	Hybridisierung	39
2.16	DNA-DNA Hybridisierung	39
2.16.1	Antikörperbindung	40
2.16.2	Detektion der Chemiluminescence	40
2.17	Sequenzanalyse	41
3.	Ergebnisse	43
3.1	Ergebnisse zur Analyse des <i>Late Flowering</i> -Locus	43
3.1.1	Untersuchungen zum Blühverhalten verschiedener <i>Lf</i> -Genotypen	43
3.1.2	Analyse differentieller Expression bei DGV und 46A	45
3.1.2.a	Expressionsanalyse mit der DDRT-PCR	47
3.1.2.b	Expressionsanalyse mit der EDD-PCR	50
3.1.2.c	Versuche zur Klonierung von Mutanten- bzw. Wildtyp-spezifischen cDNAs mittels der SSH	53
3.1.2.d	Differentielles Dot-Blot-Screening	56
3.1.2.e	Sequenzanalyse	57
3.1.2.f	Virtueller Northern Blot	59
3.1.2.g	Wiederholung der SSH	60
3.1.2.h	Reverser virtueller Northern-Blot	61
3.1.2.i	Sequenzanalyse	62
3.2	Ergebnisse zur Analyse des <i>Development Funiculus</i> -Locus	66
3.2.1	Kreuzung und Aufspaltung der Pflanzen	66
3.2.2	Amplified Fragment Length Polymorphism-Analyse (AFLP)	67
3.2.3	Silberfärbung der AFLP-Profile	69
3.2.4	Auswertung der AFLP-Reaktionen	71
3.2.5	DNA-Polymorphie zwischen DGV und PF	72
3.2.6	Bulked Segregant-Analyse	72

3.2.7	F2-Einzelpflanzen-Analyse	75
3.2.8	Kombinierte Bulked Segregant- und Einzelpflanzen-Analyse .	77
3.2.9	Umwandlung von AFLP-Markern in sequenzspezifische Marker (STS-Marker)	78
3.2.10	Umwandlung von AFLP-Markern in sequenzspezifizierte AFLP- Marker	81
3.2.11	Rekombinationsfrequenzen der Marker zu dem <i>def</i> -Genort .	84
3.2.12	Multipunktanalyse zur Erstellung von Kopplungskarten	86
3.2.12.a	Vorgehensweise in MAPMAKER	86
3.2.12.b	Vorgehensweise in JoinMap	88
3.2.12.c	Karten der in Kopplung mit dem Wildtypallel des <i>def</i> - Genortes vorliegenden Marker	89
3.2.12.d	Karten der in Kopplung mit dem Mutantenallel des <i>def</i> - Genortes vorliegenden AFLP-Marker	91
4.	Diskussion	93
4.1	Expressionsanalyse der Blüteninitiation mittels verschiedener <i>Late</i> <i>Flowering</i> -Genotypen	95
4.1.2	Pflanzenmaterial	95
4.1.3	Differential Display-PCR	96
4.1.3.a	Differential Display Reverse Transcribed PCR	97
4.1.3.b	Enhanced Differential Display	98
4.1.4	Suppression Subtractive Hybridization	99
4.1.4.a	Überprüfung differentieller Expression	100
4.1.4.b	Sequenzanalyse der SSH	100
4.1.5	Zusammenfassende Beurteilung der Ergebnisse der Analyse differentieller Expression	103
4.1.6	Ausblick für den <i>Late Flowering</i> -Locus	105
4.2	Kartierung des <i>def</i> -Locus	108
4.2.1	Amplified Fragment Length-Polymorphism-Analyse	108
4.2.2	Silberfärbung	111
4.2.3	Pflanzenmaterial	112
4.2.4	Bulked-Segregant-Analyse	113
4.2.5	F2-Einzelpflanzen-Analyse	114
4.2.6	Kombinierte Bulked Segregant- und Einzelpflanzen-Analyse	115

4.2.7	Zweipunktanalyse der Rekombinationsfrequenzen	115
4.2.8	Beurteilung der Rekombinationsfrequenzen der Marker zum <i>def</i> -Locus unter Berücksichtigung der F2-Pflanze 148	116
4.2.9	Konversion von AFLP-Markern in STS-Marker und ssAFLP-Marker	116
4.2.10	Kopplungskarten für die Region um den <i>def</i> -Genort	118
4.2.11	Ausblick für den <i>def</i> -Locus	120

Literaturverzeichnis	122
---------------------------------------	------------

Anhang	137
A. Ergebnisse der BLAST/EST-Homologie-Vergleiche der Klone aus der SSH-Analyse (3.1.5)	137
B. Definition der EST- und cDNA-Banken	139
C. Datensatz zur F2-Aufspaltung	141

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BAC	Bacterial artificial chromosome
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bulked Segregant Analysis
cDNA	copy DNA
cM	centiMorgan
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DDRT	Differential Display Reverse Transcription
DEA	Diethanol-Amin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
<i>def</i>	<i>Development Funiculus</i>
<i>df</i>	Freiheitsgrade
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DGV	Dippes Gelbe Viktoria
DIG	Digoxygenin
DNA	desoxyribo nucleic acid
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDD	Enhanced Differential Display

EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat
<i>efr</i>	<i>early flower</i>
EtBr	Ethidiumbromid
<i>g</i>	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
g	Gramm
h	Stunden
Kbp	Kilobasenpaare
l	Liter
LB	Lauria Bertani-Medium
<i>Lf</i>	<i>Late Flowering</i>
LOD	Log of the odds
Log	Logarithmus
M	Molar
μ	Micro
max.	maximal
Mbp	Megabasenpaare
mg	milligramm
min	Minute
mM	Millimolar
MOPS	3-Morpholino-1-propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
NBT	Nitro-Blau-Tetrazoliumchlorid
NCBI	National Center for Biological Information
neg.	negativ
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PEG	Polyethylenglycol
PF	Pjajbjergfonden 42403
pH	neg. decadische Log der H ₃ O ⁺ -Konz.

PVP	Polyvinylpyrrolidon
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
ssAFLP	sequenzspezifizierter AFLP
SSC	Sodium Saline Citrate
SSH	Suppression Subtractive Hybridization
SSR	Simple Sequence Repeat (Mikrosatellit)
STS	Sequenze Tagged Site
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>Taq</i>	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
TNE	Tris-Natriumchlorid-EDTA
Tris	Tris(hydroxymethyl)amminomethan
U	Unit
ÜN	über Nacht
UV	ultraviolett
Vf	Verdünnungsfaktor
Vol.	Volumen
v/v	Volumenanteil pro Volumen
w/v	Gewichtsanteil pro Volumen
YAC	Yeast artificial chromosome

1. Einleitung

1.1 Der *Late Flowering* -Locus

Der Übergang von der vegetativen zur reproduktiven Phase, also der Blühbeginn, ist ein Schlüssel-Ereignis in der Entwicklung aller höheren Pflanzen. Der optimal gewählte Zeitpunkt für die Initiation der Blüte ist entscheidend für die erfolgreiche Vermehrung einer Pflanze.

Einerseits wird er stark von den äußeren Bedingungen des jeweiligen Standortes beeinflusst und erlaubt der Pflanze damit eine bestmögliche Adaption an die Umwelt. Andererseits ist er abhängig von der inneren Entwicklung der Pflanze, die einen ausreichenden Reifezustand für eine erfolgreiche Blüte erreicht haben muss.

Erkenntnisse über diesen Vorgang sind gleichermaßen von grundlegendem wie von angewandtem Interesse, und so ist die Regulation der Blüte Objekt andauernder, intensiver Untersuchungen. Es werden hauptsächlich physiologische und genetische Ansätze verfolgt und miteinander kombiniert, wobei Pfropfungsexperimente und die Untersuchung von Blüh-Mutanten wesentlich zum heutigen Verständnis beigetragen haben.

Das erste Modell für eine Kontrolle der Blütezeit war das Florigen/Antiflorigen-Konzept (EVANS, 1971). In Pfropfungsexperimenten festgestellte Blüh-Stimuli und -Inhibitoren gaben Anlass zu der Annahme, dass stimulierende und inhibierende Hormone aus den Blättern in den Spross-Apex wandern. Diese konnten jedoch trotz langjähriger Untersuchungen des Phloemsaftes nicht gefunden werden.

In einem zweiten Modell wurde dieses anscheinende Fehlen von Blüh-Hormonen durch die Hypothese erklärt, dass eine unterschiedliche Konzentration an in den Spross-Apex wandernden Assimilaten die Blüte stimulieren oder inhibieren sollte (BERNIER, 1988).

Das dritte Modell einer multifaktoriellen Kontrolle der Blütezeit geht von einem Zusammenspiel einer größeren Anzahl von Promotoren und Inhibitoren aus und schließt dabei auch Hormone und Assimilate ein (BERNIER, 1988). Dieses Modell einer multifaktoriellen Kontrolle bleibt bis heute die Grundlage aller weiterentwickelten Konzepte und wird durch die Erkenntnisse der letzten Jahre gestützt.

Für den Großteil der Untersuchungen wird mittlerweile die genetische Modell-Pflanze *Arabidopsis thaliana* verwendet. Es wurden für diese Pflanze vor allem in den letzten zehn Jahren ausgedehnte Erkenntnisse über die Blüteninitiation gewonnen, eine Vielzahl an involvierten Genen identifiziert, zum Teil kloniert und komplexe Modelle für das Zusammenwirken dieser Gene postuliert. So sind über 80 Blühgene bei *Arabidopsis* bekannt (SIMPSON et al., 1999), von denen zum Zeitpunkt der Niederschrift dieser Arbeit 35 kloniert waren¹. Die Modelle für eine Kontrolle der Blütezeit in *Arabidopsis* sind andauernder Fortentwicklung unterworfen (MARTÍNEZ-ZAPATER et al., 1995; KOORNEEF et al., 1998; LEVY et al., 1998; SIMPSON et al., 1999; SIMPSON und DEAN, 2002).

In diesen fortlaufenden Modellen werden jedoch durchgängig vier Hauptwege unterschieden. Der Photoperiodik- und der Vernalizations-Weg vermitteln Umwelt-Reaktionen während der autonome und der Gibberellinsäure-Weg unabhängig von Umwelteinflüssen operieren. Diese vier Wege beeinflussen und regulieren parallel die Funktion oder Expression von sogenannten “Floral Pathway Integrator”-Genen (SIMPSON und DEAN, 2002), welche schließlich sogenannte Blüh-Meristem Identitäts-Gene beeinflussen (PIDKOWICH et al., 1999).

Aufgrund der eingeschränkten Eignung für Pfropfungsexperimente und der sehr kleinen Blüte von *Arabidopsis*, aber auch wegen der großen Zahl zur Verfügung stehender gut charakterisierter Blühmutanten, sind parallel zu den oben aufgeführten Untersuchungen eine Vielzahl von Experimenten mit anderen Species und darunter im besonderen mit der Erbse (*Pisum sativum* L.) durchgeführt worden.

Das erste Modell für die Kontrolle der Blüteninitiation bei der Erbse war das sogenannte Balance-Modell (MURFET, 1971). Sein Grundprinzip gleicht dem der für *Arabidopsis* entwickelten Modelle: Ein Blührepressor steht unter positiver und negativer Kontrolle von Blüh-Stimuli und Blüh-Inhibitoren, und der Blühbeginn ist eine Funktion des Gleichgewichtes dieser Kontrolle. Bei der Erbse sind zehn Gene bekannt und gut charakterisiert, die einen Einfluss auf die Blütezeit ausüben (MURFET, 1990; WELLER et al., 1997). Ihre Funktion konnte in einer aktualisierten und erweiterten Beschreibung des Balance-Modells genauer definiert werden (WELLER et al., 1997).

¹Eine aktualisierte Liste der gegenwärtig klonierten Blühgene von *Arabidopsis thaliana* kann unter der folgenden Internetadresse eingesehen werden: http://www.salk.edu/LABS/pbio-w/flower_web.html

Eine Schlüsselrolle bei der Blühinitiation der Erbse fällt dem *Late Flowering*-Gen mit dem Gensymbol *Lf* zu. Das *Lf*-Gen war das erste bedeutende Blühgen, das bei der Erbse identifiziert wurde (HOSHINO, 1915; WHITE, 1917). Es nimmt die Funktion des zentralen Blührepressors ein, welcher, einem Schwellenwert vergleichbar, von dem Blühsignal überschritten werden muss. Erst dann wird die Blüte initiiert. Pfropfungs-Experimente deuten darauf hin, dass das *Lf*-Gen im Spross-Apex agiert (MURFET, 1971).

Der *Late Flowering*-Locus wirkt unbeeinflusst von Umweltbedingungen. Seine Schwellenwertfunktion kann jedoch je nach genetischer Disposition der anderen Blühgene und den äußeren Einflüssen unterschiedlich schnell überwunden werden. Bei maximalen induktiven Bedingungen legt der *Lf*-Locus jedoch immer den minimalen Nodus für die erste Blüte fest (WELLER et al., 1997). Damit besitzt es eine herausragende praktische Bedeutung (MURFET, 1990).

Vom *Late Flowering* Locus sind über zwanzig unabhängig induzierte Mutanten beschrieben worden. Es ist zehnfach empfänglicher für Mutationen als alle anderen Blühgene und damit das bei weitem am häufigsten mutierte Blühgen der Erbse. So wurden auch die Mehrzahl aller induzierten Blüh-Mutanten letztendlich auf diesen Locus zurückgeführt (MURFET und REID, 1993). Dabei tritt das Gen in vier verschiedenen Allelklassen auf ($Lfd > Lf > lf > lfa$), die in minimalen Blühnodi von 15, 11, 8 und 5 resultieren (TAYLOR und MURFET, 1993).

Aus Mutagenese-Experimenten der Erbsensorte "Dippes Gelbe Viktoria" (DGV) mit Röntgenbestrahlung (GOTTSCHALK, 1989) stammt die Mutante 46 A, die Träger einer Mutation des *Lf*-locus von *Lf* zu *lfa* mit der Bezeichnung *efr* (*early flower*) ist (Abb. 1.3). Dieses extreme Allel führt zu den am frühesten blühenden Erbsen, die bekannt sind. Die Vorverlagerung der Blüh- und Reifeprozesse ist besonders an extremen Standorten mit kürzerer Vegetationsperiode von großer wirtschaftlicher Bedeutung. So überlebte 1973 bei Freilandversuchen in Udaipur/West-Indien mit einer großen Anzahl verschiedener Genotypen als einziger der *efr*-Genotyp und konnte Samen produzieren (GOTTSCHALK, 1989).

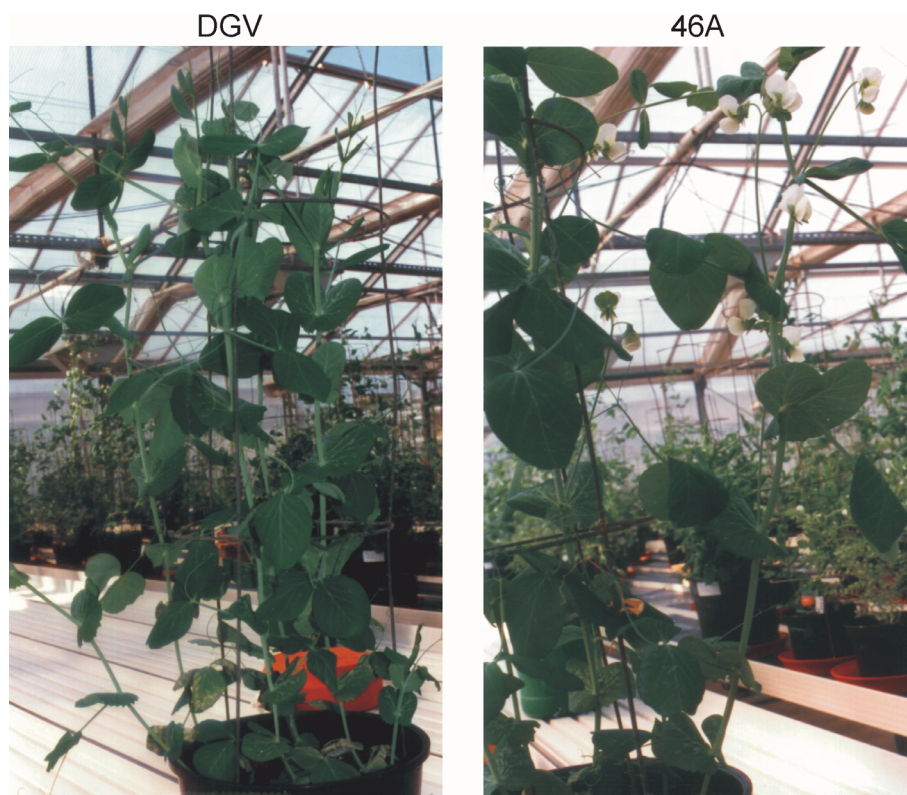


Abb. 1.3: Der Phänotyp der *Late Flowering*-Mutation *lfa* 40 Tage nach Aussaat befindet sich der *Lf*-Wildtyp DGV noch in der vegetativen Phase während die *lfa*-Mutante 46A schon an mehreren aufeinander folgenden Nodi Blüten ausgebildet hat.

1.1.1 Konzept für eine Charakterisierung der Blüteninitiation

Für eine molekulare Charakterisierung der Blühinitiation der Erbse unter spezieller Fokussierung auf das *Lf*-Gen wurde eine Analyse der differentiellen Expression auf Ebene der Transkription ausgewählt. Verschiedene Methoden zur Analyse differentieller Expression sind erfolgreich angewandt worden, und ein umfassender Überblick darüber kann in MATZ und LUKYANOV (1998) und WEISSMANN (1999) gefunden werden.

Die wohl verbreitetste Anwendung finden die “Differential Display”-Methode (“DD” oder “DDRT-PCR”, LIANG und PARDEE, 1992) mit vielen Varianten, die “Suppression Subtractive Hybridization” (“SSH”, DIATCHENKO et al., 1996; GURSKAYA et al., 1996)

und in letzter Zeit verstärkt die verschiedenen sog. "Array"-Techniken (HELLER, 2002).

Der generelle Vorteil einer "Transkriptom"-Analyse, also einer Analyse auf Ebene der mRNA, liegt in der direkten Konzentration auf die transkribierten Loci unter Umgehung aufwendiger kartengestützter Klonierungsexperimente, gerade bei Organismen mit extrem großen Genomen wie der Erbse.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Vergleich der Expression der Wildtyplinie DGV mit der Mutante 46 A durchgeführt. Außer der Mutation des *Lf*-Gens zeigt die 46 A keine weiteren Veränderungen und kann deswegen als eine isogene Linie der DGV betrachtet werden. Veränderungen in der Expression sollten deswegen in direktem oder indirektem Zusammenhang mit dem mutierten Locus stehen.

1.2 Der *Development Funiculus-Locus*

Innerhalb der Angiospermae werden die verschiedenen Fruchtformen gemäß der Art und Weise, in der ihre Öffnung erfolgt, in zwei Klassen unterteilt: die Schließfrüchte und die Öffnungsfrüchte (STRASBURGER et al., 1991). Zu der Klasse der Öffnungsfrüchte zählen die Früchte der Ranunculaceae, Cruciferae, Brassicaceae und der Leguminosae.

Nach dem Abreifen erfolgt hier eine natürliche Verbreitung der Samen, in dem diese durch eine Ablösung von der Verbindung zum Ovar, dem Funiculus, und weiterhin durch eine Öffnung der Fruchtblätter, der Karpelle, von der Pflanze getrennt und ausgestreut werden. Sowohl die Ablösung vom Funiculus als auch die Öffnung der Karpelle erfolgt an eigens dafür angelegten Abscissionszonen, wobei die Abscissionszone am Funiculus als Hilum (Nabel) bezeichnet wird. Sowohl das Ablösen der Samen vom Funiculus als auch das Aufspringen der Karpelle erfolgt in Verbindung mit einer abnehmenden Feuchtigkeit der reifenden Früchte (Abb. 1.1).

Das selbsttätige Ausstreuen der Samen durch den oben beschriebenen Mechanismus der Öffnungsfrüchte verursacht in einer Vielzahl von Nutzpflanzen, darunter vor allem bei Ölsamen-Pflanzen wie Raps und Senf (MCLEOD et al., 1981; CHILD et al., 1998), aber auch bei Leguminosen wie Sojabohne (PHILBROOK und OPLINGER, 1986), Erbse (JACKSON und MILLER, 1999), Linse (MODEN et al., 1986) und Hornklee (GARCIA-DIAZ und STEINER, 2000) schwere Ernteverluste, die unter ungünstigen Umständen bis zu 50 % des möglichen Ertrages erreichen können.

Mit dem Fortschreiten der Fruchtreife werden trocknende Schoten und Hülsen zerbrechlich und können schon durch geringste Zufuhr mechanischer Energie, z. B. durch Wind oder Erntemaschinen, aufplatzen und die Samen ausstreuen. Aus diesem Grunde, aber auch wegen des sukzessiven Abreifens der Früchte über einen längeren Zeitraum, ist der optimale Erntezeitpunkt sehr schwer festzulegen. So muss die Ernte wegen der dann erhöhten relativen Luftfeuchtigkeit und dem befeuchtenden Morgentau oft in der späten Nacht oder am frühen Morgen durchgeführt werden (MUEHLBAUER et al., 1997). Daneben werden auch Chemikalien wie z. B. organische Polymere eingesetzt, die einen bedeckenden Film über die Früchte legen und so die Feuchtigkeit in den Früchten erhalten (ENGAGE Agro Corporation, 2002).



Abb. 1: Abscissionszonen bei der Fruchttöfnung von *Brassica napus*. Eine geschlossene (oben) und eine aufgesprungene (unten) Schote mit Karpell-Abscissionszone (weisser Pfeil) und Hilum (blauer Pfeil).

Das Phänomen der Abscission von Organen bei der Pflanze ist seit vielen Jahrzehnten Objekt intensiver Forschung. Hauptsächlich wurden dabei die Morphologie der Abscissionszone, die Beteiligung von Phytohormonen wie Abscisinsäure (ABA) und Ethylen und in den letzten Jahren verstärkt die molekularen Mechanismen, die dem Prozess der Abscission zugrunde liegen, untersucht. Eine umfassende Übersicht ist in den Publikationen von ROBERTS (2000) und PATTERSON (2001) gegeben worden.

Bezüglich der Abscissionszonen speziell bei der Frucht wurde in kürzlich durchgeführten molekularen Analysen der Einfluss der *SHATTERPROOF*²-MADS-Box-Gene (*SHP 1*, *SHP 2*) auf die Differenzierung der Abscissionszonen der Karpelle in *Arabidopsis thaliana* beschrieben (LILJEGREN et al., 2000). In den *shp 1 shp 2* Doppel-Mutanten unterblieb die Fruchttöfnung aufgrund der nicht entwickelten Abscissionszone der Karpelle, und es wurde die Möglichkeit diskutiert, Ernteverluste durch das vorzeitige Ausstreuen der Samen mittels biotechnologischer Methoden reduzieren zu können.

Wir haben die zweite essentielle Komponente des Fruchttöfnungsprozesses für eine molekulare

² Das vorzeitige Ausstreuen der Samen wird im englischen als “pod shatter” bezeichnet. *SHATTERPROOF* bezeichnet damit die Verhinderung dieses “pod shatter”-Phänomens.

Charakterisierung ausgewählt, nämlich die Abscissionszone zwischen Samen und Funiculus, das Hilum.

In der Erbse, *Pisum sativum* L., wurde eine spontane, monogene und rezessive Mutation selektiert, die zu einer leicht veränderten Morphologie des Funiculus inklusive des Verlustes des Hilums führt (ROZENTAL, 1966; SWIECICKI und WOLKO, 1990). Als Folge davon bleiben die Samen auch dann mit der Hülse verbunden, wenn die Fruchtblätter aufplatzen (Abb. 1.2). Dieser Charakter wurde als “*Development Funiculus*” mit dem Gensymbol *def* benannt (KHANGILDIN und KHANGILDIN, 1969). *Def* kommt als einer einfachen, monogenen Mutation eine besondere Bedeutung zu, da es nach unserem Wissen das einzige bis heute bekannte Gen ist, das ausschließlich die Hilum-Abscissionszone ohne pleiotrope Effekte beeinflusst. Damit ist es vergleichbar mit den *SHATTERPROOF*-Genen, die nur die Karpell-Abscissionszonen bei *Arabidopsis thaliana* zu beeinflussen scheinen. Andere, in die Organ-Abscission involvierte Gene, wie *DELAYED DEHISCENCE 1* (SANDERS, 2000) oder *JOINTLESS* bei der Tomate (MAO, 2000), haben vielfältigere und unspezifischere Effekte. In der Konsensus Karte für die Erbse von 1998 liegt das *def*-Gen distal am unteren Ende der Kopplungsgruppe VII, die dem Chromosom Nr. 4 entspricht (WEEDEN, 1998).

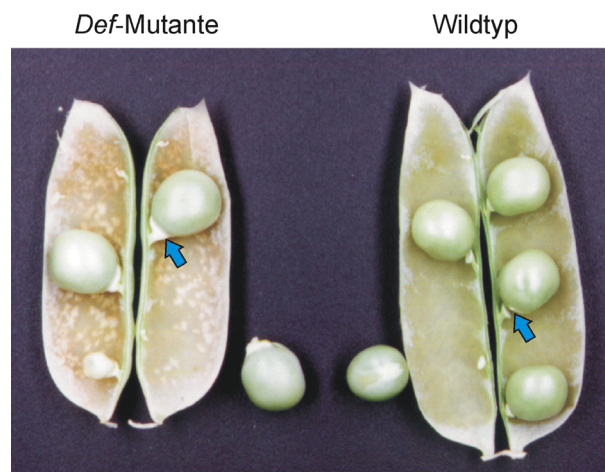


Abb 1.2: Phänotyp der *Development Funiculus* Mutation
Der blaue Pfeil kennzeichnet das Funiculus. Beim Wildtyp rechts mit intaktem Hilum und bei der *Def*-Mutante links mit nicht ausgebildetem Hilum.

1.2.1 Konzept für eine Charakterisierung des *def*-Gens

Das Fernziel dieser Arbeiten ist es, das *def*-Gen über eine kartengestützte Klonierung zu isolieren. Hierfür benötigt man in einem ersten Schritt eine hochauflösende genetische Karte der engeren Umgebung des Genlocus, welche in einem zweiten Schritt in eine physikalische Karte überführt wird, basierend auf überlappenden BAC- oder YAC-Klonen ("Contig"), die das entsprechende chromosomale Stück überspannen. In dem "Chromosome Walking" genannten dritten Schritt werden dann in einer Kombination aus Subklonierung und Sequenzierung mögliche Gen-Kandidaten identifiziert. Schließlich muss die Genfunktion in einer Komplementation-Analyse verifiziert werden.

In der vorliegenden Arbeit sollte mit der Erstellung einer hochauflösenden genetischen Karte für den *def*-Locus die Basis für die Positionsklonierung bereit gestellt werden.

Von der Saatgutfirma Pajbjergfonden wurde uns freundlicherweise ein Zuchtstamm der Erbse überlassen, der Träger der *def*-Mutation ist und den wir zusammen mit der deutschen Zuchtsorte Dippes Gelbe Viktoria für eine Kreuzung und die Gewinnung einer segregierenden F₂-Generation genutzt haben.

Zur Gewinnung einer möglichst hohen Anzahl von Marker-Loci wurde die "Amplified Fragment Length Polymorphism"-Technik (AFLP, VOS et al., 1995) verwendet. Sie kann ohne spezifische DNA-Sequenzinformationen in den unterschiedlichsten Organismen eingesetzt werden und überzeugt durch eine schnelle und reproduzierbare Amplifikation und Visualisierung einer sehr großen Anzahl von genetischen Loci. Im Vergleich liegt sie bei der Anzahl amplifizierter Loci weit vor allen anderen Marker-Techniken und wird bei dem detektierten Polymorphiegrad nur von den Mikrosatelliten (SSR) übertroffen (GARCIA-MAS et al., 2000; PATZAK, 2001).

Die Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)-Methode, die, vergleichbar mit der AFLP-Methode, auch ohne Vorinformationen genutzt werden kann, birgt große Probleme bei der Reproduzierbarkeit ihrer Bandenmuster (ELLSWORTH et al., 1993; SKROCH und NIENHUIS, 1995; KHANDKA et al., 1997).

Die AFLP-Methode ist vielfach erfolgreich für kartengestützte Klonierungen angewendet worden (COLWYN et al., 1995; LAHAYE et al., 1998; SCHWARZ et al., 1999).

Die AFLP-Methode wurde in der vorliegenden Arbeit in Kombination mit Silberfärbung

durchgeführt, einer Verbindung, die mittlerweile verschiedentlich und auch gerade bei der Erbse wiederholt dokumentiert worden ist (CHALHOUB et al., 1997; TIWARI, 1999; COYNE, 2000).

In dieser Arbeit werden also zwei grundsätzlich verschiedene Ansätze, nämlich die Transkriptomanalyse (*Lf*-Locus) und die Genomanalyse (*def*-Locus) zur molekularen Charakterisierung interessierender Loci angewendet. Dabei sollen auch die Eigenarten dieser Methoden gegenübergestellt werden und deren Eignung bei Pflanzen mit großen Genomen bewertet werden.

2. Material und Methoden

In den durchgeführten Arbeiten wurde mit verschiedenen grundlegenden molekularbiologischen Arbeitsmethoden gearbeitet. Die spezifischen Anwendungen und Variationen dieser Methoden sind dort, wo sie verwendet wurden, aufgeführt. Ein generelles Protokoll für diese Methoden wird deshalb nicht beschrieben.

2.1 Arbeiten mit Bakterien

Generell wurden Arbeiten mit Bakterien nach SAMBROOK et al. (1989) durchgeführt, soweit nicht anders vermerkt.

In den durchgeführten Arbeiten wurden *Escherichia Coli*-Bakterien der Stämme "XL1 Blue" (Stratagene) und "TOP10F' OneShot"(Invitrogen) verwendet.

Bakterien wurden bei -80 °C in Dauerkulturen mit einer finalen Glycerinkonzentration von 15 % gelagert. Eine kurzfristige Lagerung bis zu 1 Woche erfolgte bei 4 °C.

2.1.1 Herstellung von transformationskompetenten Bakterien

Bakterien wurden nach der Methode von HANAHAN (1983) für Transformationen kompetent gemacht.

Ein frischer Ausstrich von *E. Coli* XL1 Blue wurde auf LM-Agarplatten ÜN angezogen. Eine Einzelkolonie mit einem Durchmesser von 2 - 3 mm wurde pro 10 ml Anzuchtmedium SOB überimpft. Die Anzucht im Flüssigmedium SOB erfolgte bei 275 rpm und 37 °C. Die Bakterien wurden bei einer optischen Dichte von 0,45 - 0,55 gemessen bei 550 nm geerntet.

Sie wurden 10 min auf Eis gekühlt und dann 12 min bei 1000 g und 4 °C sedimentiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Bakterienpellet vorsichtig in 1/3 Volumen FSB gelöst. Die Lösung wurde 10 min auf Eis gekühlt. Es wurde für 10 min bei 1000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Bakterienpellet in 1/12,5 Ausgangsvolumen FSB vorsichtig

resuspendiert. Es wurde DMSO bis zu einer 3,5 % Konzentration zugegeben, gemischt und für 5 min auf Eis inkubiert. β -Mercaptoethanol wurde bis zu einer 25 mM Konzentration dazu gegeben und für 10 min auf Eis inkubiert. Es wird DMSO bis zu einer finalen Konzentration von 7 % zugegeben und für 5 min auf Eis inkubiert. Die Bakterienlösung wird in 200 μ l Portionen in auf Eis vorgekühlte Mikroreaktionsgefäße pipettiert. Diese werden in flüssigem Stickstoff schockgekühlt und bis zur Verwendung bei - 80 °C gelagert.

Die verwendeten Lösungen setzten sich wie folgt zusammen:

LM-Agar:

1 % (w/v) Trypton
0,5 % (w/v) Hefeextrakt
10 mM NaCl
10 mM Magnesiumsulfat
1,5 % (w/v) Agar

FSB:

10 mM Kaliumacetat
100 mM Kaliumchlorid
45 mM Manganchlorid
10 mM Kalziumchlorid
3 mM Hexakobaltchlorid
10 % redestilliertes Glycerin
pH 6,4 mit 0,1 M Salzsäure
sterilfiltrieren

SOB-Medium:

2 % (w/v) Trypton
0,5 % (w/v) Hefeextrakt
10 mM NaCl
2,5 mM Kaliumchlorid

nach dem Autoklavieren:

10 mM Magnesiumsulfat (sterilfiltriert)
10 mM Magnesiumsulfat (streifiltriert)

2.1.2 Transformation von Bakterien

Die Transformation von Bakterien erfolgte nach den Herstellerangaben des pGEM-T-Easy-Systems (Promega).

2.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Plasmid-DNA wurde aus Bakterien mit dem QIAEX-Plasmid-Mini-Extraktions Kit (Qiagen) oder dem Invisorb Plasmid Mini Kit (InVitec) nach Angaben des Herstellers isoliert. Die Konzentration und Reinheit der DNA wurde spektrophotometrisch bestimmt.

2.2 Pflanzen

In der vorliegenden Arbeit wurden Pflanzen der Erbse, *Pisum sativum* L., verwendet. Um eine optimale und gleichmäßige Keimung zu gewährleisten, wurden auszubringende Erbsensamen ÜN in Wasser vorgequollen. Die Pflanzen wurden im Gewächshaus unter mindestens 16 Stunden Kunst- und Tageslicht angezogen. Samen wurden nach vollständiger Abreife geerntet und trocken bei RT gelagert. Als Pflanzenmaterial für molekulare Analysen wurden, soweit nicht gesondert beschrieben, pro Pflanze einige möglichst junge Blätter geerntet und bei - 80 °C gelagert.

Kreuzungen wurden per Hand durchgeführt. Hierbei wurden noch unreife Blüten geöffnet, deren noch nicht fertile Staubbeutel mittels Pinzette entfernt und eine Bestäubung der Narbe mit reifen Pollen des Kreuzungspartners durchgeführt. Die Blüte wurde dann wieder geschlossen und markiert. Die Kreuzungspartner wurden wechselseitig als männlicher und als weiblicher Befruchter eingesetzt. In den F1- und F2-Generationen wurde die Selbstbefruchtung der autogamen Pflanzen zugelassen.

2.2.1 Pflanzen für die Analyse des *Late Flowering*-Gens

Für die Untersuchungen zum *Late Flowering* Gen wurden die Mutante 46 A und deren Ausgangsform DGV verwendet. 46 A ist Träger der *lfa*-Mutation des *Lf*-Locus und stammt aus Mutagenese-Experimenten durch Röntgenbestrahlung der Sorte DGV (GOTTSCHALK, 1989). Während DGV als Träger des Wildtyp-Allels *Lf* frühestens ab dem 11. Nodus blüht, ist bei der Mutante eine Blüte schon ab dem 5. Nodus zu beobachten.

DGV wurde mit 46 A gekreuzt, die uniforme F1 wurde geselbstet und die Aufspaltung der

Pflanzen der F2 anhand des Blühbeginns bonitiert.

Zur Charakterisierung der Blüteninitiation wurde mit verschiedenen Methoden die Transkriptionsebene der Mutante 46A und ihrer Ausgangsform DGV verglichen.

DGV- und 46A-Pflanzen wurden parallel angezogen. Stichproben von Spross-Apices der Mutante und des Wildtyps wurden unter dem Binokular herauspräpariert und verglichen. Zu dem Zeitpunkt, an dem bei der frühblühenden Mutante der Blühbeginn deutlich sichtbar eingeleitet worden war, wurden Spross-Apices beider Pflanzen herauspräpariert, sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in eine RNA-Isolierung eingesetzt. Diese RNA wurde für die Transkriptionsanalysen verwendet.

2.2.2 Pflanzen für die Analyse des *Development Funiculus*-Gens

Im Fall des *Development Funiculus* Gens wurden die Sorte Dippes Gelbe Viktoria (DGV) und die Varietät PF 42403 der Saatzuchtfirma Pajbjergfonden eingesetzt. DGV ist in der Pisum Kollektion des John Innes Center mit der Accessions-Nummer JI2413 aufgeführt. PF 42403 (PF) ist ein Zuchtstamm der auf eine Kreuzung der russischen Sorte "Cisia" und der Pajbjergfonden-Sorte "BODIL" zurückgeht. PF ist homozygoter Träger der rezessiven *def*-Mutation, die zu der veränderten Morphologie des Funiculus einschließlich des Verlustes der Abscissionszone, des Hilums, führt.

DGV wurde mit PF gekreuzt, die uniforme F1 wurde geselbstet und 480 Pflanzen der F2-Population wurden phänotypisch anhand des *def*-Merkmales klassifiziert. Bis zu 14 F3-Pflanzen der den Wildtyp Phänotyp aufweisenden F2-Pflanzen wurden angezogen und bonitiert, um die hetero- und homozygoten F2-Pflanzen unterscheiden zu können.

2.3 DNA-Isolierung aus Pflanzenmaterial

Es wurde Gesamt-DNA mittels einer CTAB-Extraktion aus dem Pflanzenmaterial extrahiert. Hierfür wurde eine verkürztes Protokoll der von DOYLE und DOYLE (1990) beschriebenen Extraktionsmethode angewendet. 1 - 3 Blätter des Pflanzenmaterials wurden unter flüssigem Stickstoff fein gemörsert. Nach vollständigem Verdampfen des Stickstoffes wurde das Blattmaterial in 2 ml Mikroreaktionsgefäße überführt und 800 µl auf 65 °C vorgewärmter

CTAB-Puffer zugegeben. Die Proben wurde unter gelegentlichem vorsichtigem Schütteln 30 min bei 65 °C im Wasserbad inkubiert. 800 µl C/I-Gemisch wurden zugegeben und die zwei Phasen kurz heftig durchmischt. Zur Phasentrennung wurden die Proben 10 min bei maximaler Drehzahl in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen. RNase A wurde bis zu einer Konzentration von 100 µg/ml zugesetzt. Die Proben wurden zum vollständigen Verdau der RNA für 30 min bei 37 °C inkubiert. Dann wurde 0,7 Volumen eiskaltes Isopropanol zugesetzt. Zur vollständigeren Fällung der DNA wurde die Probe für 5 - 30 min bei RT inkubiert. Die DNA wurde 2 min bei 600 g abzentrifugiert, der Überstand möglichst vollständig dekantiert und 1 ml Waschpuffer zugesetzt. Die Proben wurden 20 min auf Eis inkubiert und 1 min bei 1000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und 1 ml 70 % Ethanol dazugegeben. Nach 5 minütiger Inkubation bei RT wurde die Probe für 2 min bei 1000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig abgenommen, das Pellet 5 - 15 min luftgetrocknet und in 200 µl TE Puffer (pH 8.0) aufgenommen. Die Lösung wurde für 10 min bei 65 °C und ÜN bei 4 °C zur vollständigen Auflösung der DNA inkubiert. Die DNA-Konzentration wurde fluorimetrisch bestimmt. Die Qualität und die Intaktheit der DNA wurde in einem Agarosegel (0,8 %) überprüft. DNA-Lösung wurde kurzfristig bei - 20 °C und über einen längeren Zeitraum bei - 80 °C gelagert.

Die verwendeten Lösungen setzten sich wie folgt zusammen:

CTAB-Puffer:

2 % CTAB
1,4 M NaCl
0,2 % (v/v) β-Mercaptoethanol
20 mM EDTA
0,5 % PVP
100 mM Tris/HCl
pH 8,0

TE-Puffer:

1mM EDTA
10 mM Tris/HCl
pH 8,0

Waschpuffer:

76 % (v/v) Ethanol
10 mM Ammoniumacetat

C/I-Lösung:

24 Teile Chloroform
1 Teil Isoamylalkohol

2.4 RNA-Isolierung aus Pflanzenmaterial

Die RNA Extraktion erfolgte mit dem RNeasy Plant Mini Kit der Firma Qiagen laut Angaben des Herstellers. Aufgrund der geringen Masse, der unter dem Binokular präparierten Spross-Spitzen, betrug das eingesetzte Ausgangsgewicht nicht mehr als 2 - 10 mg. Da es sich jedoch um meristematisches Gewebe mit einer sehr hohen Zelldichte handelt, wurden pro Isolation bis zu 150 µg RNA gewonnen. Die RNA-Konzentration wurde spektrophotometrisch bestimmt. Die RNA-Qualität wurde in einem denaturierenden RNA-Agarosegel überprüft. Die RNA-Lösung wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei - 80 °C gelagert.

2.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

2.5.1 Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentrationsbestimmung von DNA erfolgte, soweit die DNA nicht mit dem Detergens CTAB isoliert worden war, im Spektralphotometer durch Messung der Extinktion bei $\lambda = 260$ nm. Dabei wurde mit folgender Korrelation zwischen der optischen Dichte und der DNA-Konzentration bei einer Schichtstärke von 1 cm kalkuliert:

$$\text{dsDNA-Konzentration} = (\text{OD } 260 \text{ nm} \cdot V_f \cdot 50) \text{ µg/ml}$$

Die Reinheit der DNA wurde durch Ermittlung des Koeffizienten aus 260 nm/280 nm überprüft. Für reine DNA liegt dieser Koeffizient bei $> 1,7$.

2.5.2 Konzentrationsbestimmung von DNA mittels Fluorimeter

Da das für die DNA-Isolierung aus Pflanzenmaterial eingesetzte Detergens CTAB sein Absorptionsmaximum ebenfalls bei 260 nm hat, und es nach Isolierung in unterschiedlich starken Spuren in der DNA zurückbleibt, wurde die Konzentration dieser DNA mit einem

Fluorimeter ermittelt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte nach den Angaben des Herstellers mit dem Fluorescent DNA Quantitation Kit der Firma BioRad unter Verwendung des Farbstoffes Hoechst 33258.

2.5.3 Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Konzentrationsbestimmung von RNA erfolgte im Spektralphotometer durch die Messung der Extinktion bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ in TE-Puffer (pH 8,0). Dabei wurde mit folgender Korrelation zwischen der optischen Dichte und der RNA-Konzentration bei einer Schichtstärke von 1 cm kalkuliert:

$$\text{RNA-Konzentration} = (\text{OD } 260 \text{ nm} \cdot \text{Vf} \cdot 40) \mu\text{g/ml}$$

Die Reinheit der RNA wurde durch Ermittlung des Koeffizienten aus 260 nm/280 nm überprüft. Für reine RNA liegt dieser Koeffizient bei konstantem pH zwischen 1,9 - 2,1.

2.6 Agarosegelelektrophorese

2.6.1 DNA-Agarosegelelektrophorese

Für die elektrophoretische Auftrennung von DNA im Agarosegel wurden verschiedene Horizontal-Elektrophorese-Anlagen genutzt. Je nach Größe der erwarteten DNA-Fragmente wurden 0,7 - 3 %ige Agarosegele eingesetzt. Als Gel- sowie Laufpuffer wurde 1 x TAE-Puffer verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei konstantem Strom zwischen 1 - 10 V/cm Elektrodenabstand. DNA-Proben wurden für den Gelauftrag mit 6 x Probenpuffer versetzt, soweit es sich nicht um PCR-Reaktionen unter Verwendung des RedTaq-Systems (SIGMA-Aldrich) handelte. Diese Proben konnten direkt ohne Zusatz eines Probenpuffers verwendet werden. Zur Abschätzung der DNA-Fragmentgrößen wurden parallel zu den zu untersuchenden Proben DNA-Längenstandards aufgetragen.

Die verwendeten Lösungen setzten sich wie folgt zusammen:

TAE-Puffer:

40 mM Tris/HCl
20 mM Eisessig
1 mM EDTA
pH 7,5

6 x Proben-Puffer:

50 mM EDTA
25 % (w/v) Ficoll 40
0,25 % (w/v) Bromphenolblau
0,25 % (w/v) Xylene-Cyanol FF

2.6.2 DNA-Isolierung aus Agarosegel

Die Isolierung von DNA aus Agarosegel erfolgte mit dem Nucleotrap Extraction Kit (Macherrey-Nagel) oder dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Die Durchführung erfolgte nach den Angaben der Hersteller.

2.6.3 RNA-Agarosegelelektrophorese

Für die elektrophoretische Auftrennung von RNA-Proben unter denaturierenden Bedingungen im Agarosegel wurden verschiedene Horizontal-Elektrophorese-Anlagen genutzt. Alle Lösungen wurden mit DEPC-Wasser angesetzt. Es wurden generell 1,2 %ige Agarosegele eingesetzt. Als Gel- sowie Laufpuffer wurde 1 x MOPS-Puffer verwendet. Zusätzlich wurden das Gel sowie der Laufpuffer bis zu einer 3 %igen Konzentration mit Formaldehyd (37 %) versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei konstantem Strom mit 4 - 6 V/cm Elektrodenabstand. RNA-Proben wurden für den Gelauftrag mit 5 x RNA-Probenpuffer versetzt, 5 min bei 65 °C denaturiert und auf Eis gekühlt.

Die verwendeten Lösungen setzten sich wie folgt zusammen:

10 x MOPS-Puffer:

200 mM MOPS
80 mM Na-Acetat
10 mM EDTA
pH 7,0

DEPC-Wasser:

0,03 % DEPC in Wasser durch schütteln lösen
bei 37 °C ÜN inkubieren, dann autoklavieren

5 x RNA-Proben-Puffer:

2mM EDTA

0,88 M Formaldehyd

20 % Glycerin

30 % Formamid

40 % 10 x MOPS

0,25 % Bromphenolblau

pH 8,0

2.7 Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Eine elektrophoretische Größenseparation von AFLP-, DDRT- und EDD-PCR-Reaktionen wurden in denaturierenden 4 % Polyacrylamidgelen in Sequi Gen Cell Sequenz-Gel-Anlagen (Bio-Rad) durchgeführt.

Damit die Gelmatrix für die anschließende Silberfärbung fest an einer der beiden Glasplatten des Gelapparates haftet, wurde diese Glasplatte 5 - 10 min mit einer Bindsilane-Lösung inkubiert, die Lösung mit Ethanol (96 %) heruntergespült und die Glasplatte mit Papierhandtüchern quer zur Laufrichtung trockengewischt. Die andere Glasplatte wurde, um eine Haftung des Gels an ihr zu verhindern, für 2 min mit Acrylease (Stratagene) inkubiert und dann mit ein paar Tropfen $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ und Papierhandtüchern klargewischt.

Für die verwendeten Gelapparate wurden 70 ml Gellösung einer 4 %igen Gellösung angesetzt. Die Polymerisationsreaktion wurde direkt vor dem Gießen des Gels durch Zugabe von 70 μl TEMED und 140 μl 10 % Ammoniumperoxodisulfat (APS) gestartet. Das Gel wurde bis zur vollständigen Polymerisation für mindestens 90 min ruhig bei RT gelagert.

Vor dem Probenauftrag erfolgte ein Elektrophorese-Vorlauf zur Equilibrierung des Gels von mindestens 20 min. Die aufzutragenden PCR-Proben wurden mit 1/5 Volumen Formamid-Probenpuffer versetzt, 5 min bei 99 °C mit geöffnetem Deckel des PCR-Gefäßes denaturiert und sofort auf Eis gekühlt. Es wurden 5 - 6 μl der Proben aufgetragen. Die Dauer der Elektrophorese variierte je nach Größe der interessierenden PCR-Produkte.

Die verwendeten Lösungen setzten sich wie folgt zusammen:

Bindsilane-Lösung:

50 ml Ethanol abs.
1,5 ml 8 %ige Essigsäure
150 µl Metacryloxypropyltrimethylsilane
(SIGMA-Aldrich)

Formamid-Probenpuffer:

98 % Formamide
10 mM EDTA
0,25 % (w/v) Bromphenolblau
0,25 % (w/v) Xylene-Cyanol FF

10 x TBE-Puffer:

54 g Tris-Base
27,5 g Borsäure
20 ml 0,5 M EDTA
pH 8,0

Gellösung:

4 % x (29 % Acryl : 1 % Bisacryl)
7,5 M Harnstoff
1 x TBE-Puffer

2.8 Silber-Färbung von DNA in Polyacrylamid-Gelen

Die Visualisierung der im Gel aufgetrennten DNA erfolgte mittels Silberfärbung und wurde nach dem Protokoll von BASSAM et al. (1991) durchgeführt.

Das auf der einen Glasplatte fixierte Gel wurde 20 min in 1 l Essigsäure (8%) inkubiert und anschließend dreimal je 2 min mit 1 l H_2O_{reinst} gespült. Dann wurde das Gel für 30 min mit 1 l Silberlösung inkubiert. Vor der Inkubation in der auf 4 - 10 °C gekühlten Entwicklerlösung wurde das Gel für maximal 5 sec in 1 l H_2O_{reinst} gespült. Die Entwicklung wurde in einer durchsichtigen oder weißen Schale durchgeführt, um die fortschreitende Färbung besser kontrollieren zu können. Der Färbeprozess der DNA wurde partiell durch lokales Aufpipettieren von Essigsäure (8%) auf das Gel und final durch sofortiges Überführen des Geles in ein Essigsäurebad (8%) gestoppt. Nach 3 min Inkubation wurde das Gel für 5 - 10 min in 1 L H_2O_{reinst} gespült und anschließend ÜN bei RT getrocknet.

Die verwendeten Lösungen setzten sich wie folgt zusammen:

Silberlösung (1 Liter):

1,5 g Silbernitrat
1,5 ml Formaldehyd (37 %)
1 L H₂O_{reinst}

Entwicklerlösung (1 Liter):

30 g Natriumcarbonat (wasserfrei)
1,5 ml Formaldehyd (37 %)
4 µM Natriumthiosulfat
1 L H₂O_{reinst}

2.9 AFLP-Analyse

Die AFLP-Analyse wurde bis auf einige Modifikationen nach dem Original-Protokoll von VOS et. al. (1995) durchgeführt. Dabei wurde weitestgehend mit dem AFLP Plant Analysis System I der Firma GIBCO-LifeTechnologies gearbeitet.

Genomische DNA wird mit *Mse* I und *Eco*R I verdaut. An die beiden überhängenden Einzelstrangenden, die sogenannten "sticky ends", werden spezifische DNA-Adapter-Fragmente ligiert. Diese dienen als bekannte Sequenzen zur Ableitung von geeigneten Primern für stringente PCR-Amplifikationen. Einer ersten Preamplifikations-PCR mit je einer selektiven Base am 3'-Ende der Preamplifikations-Primer folgt eine selektive PCR mit je drei frei wählbaren selektiven Basen am 3'-Ende der selektiven Primer. Durch Einsatz der selektiven Basen wird eine geeignete Anzahl der verdauten und ligierten Fragmente amplifiziert (siehe Abb. 3.16).

2.9.1 Restriktionsverdau

400 ng Gesamt-DNA wurden mit 4 U *Eco* RI und 4 U *Mse*I in einem finalen Volumen von 25 µl 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgAc, 50 mM KAc, zwei Stunden bei 37 °C verdaut. Die Proben wurden zur Inaktivierung der Endonucleasen für 15 min bei 70 °C erhitzt.

2.9.2 Adapter-Ligation

Es wurden 24 µl einer Adapter-Ligations-Lösung, 5 pMol *Eco* RI-Adapter, 50 pMol *Mse*I-Adapter, 0,4 mM ATP, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgAc, 50 mM Kac (GIBCO-LifeTechnologies) und 1 U T4-DNA-Ligase (GIBCO-LifeTechnologies) zugegeben und für zwei Stunden bei 20 °C im Kühlwasserbad inkubiert. Der vollständige Verdau und die gleichmäßige Ligationseffizienz wurden in einem 1,5 % Agarosegel überprüft. Die Proben wurden 1 : 10 mit TE Puffer pH 8,0 verdünnt. Die nicht verwendeten Reste wurden bei - 80 °C gelagert.

2.9.3 Preamplifikation

Die Preamplifikationsreaktion wurde in einem 0,2 ml oder 0,5 ml PCR-Reaktionsgefäß durchgeführt. Die Reaktion mit einem Gesamtvolumen von 50 µl enthielt 5 µl der Verdünnung je 30 ng der Preamplifikations-Primer, 5 µl des Red*Taq*-PCR-Puffers und 1 µl Red*Taq*-Polymerase (1 U/µl, SIGMA-Aldrich). Es wurden 20 PCR-Zyklen a 94 °C für 30 sec, 56 °C für 60 sec und 72 °C für 60 sec durchgeführt. Die Gleichmäßigkeit der Preamplifikation wurde in einem 1,5 % Agarosegel überprüft. Die Proben wurden 1 : 50 mit TE Puffer, pH 8,0, verdünnt. Die nicht verwendeten Reste wurden bei - 80 °C gelagert.

2.9.4 Selektive Amplifikation

In der selektiven PCR wurden je 16 *Eco* RI-spezifische (E-Primer) und 16 *Mse*I-spezifische Primer (M-Primer) eingesetzt. Sowohl die E-Primer als auch die M-Primer unterschieden sich nur in den letzten zwei Nukleotiden am 3'-Ende, da die erste selektive Base der E-Primer immer ein Adenin und der M-Primer immer ein Cytosin war. Insgesamt ergaben sich 256 Primer-Kombinationsmöglichkeiten. Die PCR-Reaktionen wurden in 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Es wurden 5 µl der verdünnten Preamplifikation, je 0,2 mM der vier dNTPs, 20 ng des E-Primers, 30 ng des M-Primers, 2 µl Red*Taq*-PCR-Puffer und 1 µl Red*Taq*-Polymerase (1 U/µl, SIGMA-Aldrich) in 20 µl finalem Volumen eingesetzt. Es wurde ein PCR-Zyklus mit 94 °C für 30 sec, 65 °C für 30 sec und 72 °C für 60 sec durchgeführt. Die Primerbindungs-Temperatur wurde in den folgenden 12 Zyklen um je 0,7 °C erniedrigt. Dann folgten 23 Zyklen

mit einer Primerbindungs-Temperatur von 56 °C. Nach Ende der PCR wurden die Proben bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

2.9.5 Elektrophorese und Färbung der AFLP-Banden-Profile

Die AFLP-Reaktionen der selektiven Amplifikation wurden in denaturierenden Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt (siehe 2.7) und mittels Silberfärbung sichtbar gemacht (siehe 2.8).

2.10 Umwandlung von AFLP-Markern in sequenzspezifische Marker

2.10.1 Umwandlung in Sequence Tagged Sites (STS)

AFLP-Banden wurden aus dem getrockneten, silbergefärbten Gel mit Hilfe eines Skalpellens ausgeschnitten und für eine Stunde in 100 µl TE Puffer (pH 8,0) in einem Mikroreaktionsgefäß inkubiert. 2 µl der Lösung wurden als Matrize in einer Reamplifikations-PCR mit den korrespondierenden selektiven Primern, dem Protokoll der selektiven Amplifikation folgend, eingesetzt. Die Reaktion wurde in einem Agarosegel (1,5 %) aufgetrennt. PCR-Produkte der erwarteten Größe wurden aus dem Gel ausgeschnitten, mit dem QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen) aus dem Gel extrahiert und direkt in den T/A-Klonierungsvektor pGEM-T-Easy (Promega) ligiert mit anschließender Transformation in *E. coli* und Blau/Weiss-Selektion. Insertionen der erwarteten Größe wurden sequenziert (MWG-Biotech) und sequenzspezifische Primer wurden von der Sequenz abgeleitet. Die Primer waren zwischen 18 und 24 bp lang und entsprachen an ihrem 5'-Ende der ursprünglichen *Eco* RI- oder *Mse*I-Restriktionsschnittstelle (REAMON-BÜTTNER und JUNG, 2000). Die PCR mit dem spezifischen Primerpaar wurde optimiert und in einem Agarosegel (2 %) aufgetrennt.

2.10.2 Umwandlung in sequenzspezifizierte AFLP-Marker (ssAFLP)

Für AFLP-Marker, deren Polymorphismus bei Einsatz sequenzspezifischer STS-Primer verloren ging, wurde eine Methode entwickelt, bei der die Sequenz der originalen AFLP-Primer um 1 - 5 sequenzspezifische Nukleotide am 3'-Ende verlängert, und, je nach G/C-Verhältnis und Schmelztemperatur, das 5'-Ende um 0 - 4 Nukleotide verkürzt wurde (VON STACKELBERG et al., im Druck). Die PCR mit diesen sequenzspezifizierten Primern wurde für das jeweilige Primerpaar optimiert und mit der AFLP-Preamplifikations-Verdünnung als Matrizen-DNA durchgeführt. Die Reaktion wurde in 2 %igen Agarose-Gelen aufgetrennt.

2.11 Erstellung einer Kopplungskarte des *def*-Locus

2.11.1 Nomenklatur der Loci

Für die AFLP-Loci wurden folgende Bezeichnungen ausgewählt, die anhand eines Beispiels erklärt werden:

“ACTT 630”

Die ersten zwei Buchstaben “A” und “C” bezeichnen die zwei letzten selektiven 3'-Basen des E-Primers (die erste selektive Base des E-Primers ist immer ein Adenin) und die zwei folgenden Buchstaben “T” und “T” bezeichnen die zwei letzten selektiven 3'-Basen des M-Primers (die erste selektive Base des M-Primers ist immer ein Cytosin). Dadurch ist die zugrundeliegende AFLP-Reaktion ausreichend definiert. Die am Ende stehende Zahl “630” bezeichnet die im Gel abgeschätzte Größe der polymorphen AFLP-Bande. Im Falle des Beispiels handelt es sich also um eine polymorphe Bande von ca. 630 bp.

Tritt die Bande bei dem Wildtyp-Elter auf, also im vorliegenden Fall bei DGV, werden wie im obigen Beispiel die Buchstaben groß geschrieben. Tritt die Bande bei der Mutante auf, also bei PF, werden die Buchstaben klein geschrieben, so zum Beispiel “**acac 270**”.

Für STS-Marker wurde vor den AFLP-Namen die Bezeichnung “**STS**” mit Bindestrich gesetzt,

zum Beispiel wurde CGAC 350 in "STS-CGAC 350" umbenannt.

Für sequenzspezifizierte AFLP-Marker wurde vor den AFLP-Namen das Präfix **ss** (sequence specified) gesetzt, zum Beispiel wurde AGTG 150 in "ssAGTG 150" umbenannt.

2.11.2 Vererbung der Loci

Für den Genort *Development Funiculus* wurde der Literatur folgend (ROZENTAL, 1966; SWIECICKI und WOLKO, 1990) eine dominante/rezessive Vererbung angenommen. Dies führt in der F2 zu einer 3 (*def*-Wildtyp) : 1 (*def*-Mutante) Aufspaltung des Phänotyps. Die erwartete genotypische Aufspaltung von 1 : 2 : 1 Verhältnis von homozygot dominanten zu heterozygoten zu homozygot rezessiven Pflanzen wurde durch eine F3-Analyse der F2-Pflanzen mit Wildtyp-Phänotyp überprüft. Bis zu 14 F3-Pflanzen wurden hierfür angezogen und ihr Phänotyp festgestellt. Während bei heterozygotem F2-Elter eine 3 : 1 Aufspaltung zu erwarten war, spalten F3-Nachkommen eines homozygoten Elter nicht auf.

Für alle beobachteten Aufspaltungen wurde die Abweichung von den erwarteten Aufspaltungsverhältnissen mit Hilfe des *chi*(χ)-Quadrat-Tests überprüft (WEBER, 1972). Als Signifikanzgrenze wurde eine 5 %ige Irrtumswahrscheinlichkeit für einen Fehler 1. Ordnung (α) festgelegt.

Für die AFLP-Loci, die ssAFLP-Loci und die STS-Loci wurde eine dominant-rezessive Vererbung angenommen. Durch die enge Kopplung der ausgewählten Loci mit dem *def*-Locus und die Beschränkung in der F2-Einzelpflanzenanalyse auf homozygot dominante und homozygot rezessive F2-Pflanzen unterlag die Aufspaltung dieser Loci einer Verzerrung, das heißt, die beobachtete Aufspaltung dieser Loci konnte nicht in Bezug zu einer erwarteten Aufspaltung auf ihre Signifikanz überprüft werden.

2.11.3 Bulked Segregant Analysis

Um mit der AFLP-Analyse direkt DNA-Polymorphismen zu detektieren, die mit dem interessierenden Genort gekoppelt vorliegen, wurde eine sog. "Bulked Segregant Analysis" (BSA, MICHELMORE et al., 1991) durchgeführt. Hierbei wird die DNA einer Anzahl von Individuen der aufspaltenden Population mit gleichem homozygoten Genotyp am interessierenden Genort vereinigt und mit vereinigter DNA von homozygoten Individuen des

anderen Genotypes verglichen. Durch das Mischen ausgewählter Genotypen, die am interessierenden Genort übereinstimmen, werden virtuelle Bulk-“Genotypen” gewonnen. Die Allele beider Eltern-Genotypen sind in diesen Bulks vermischt, bis auf die den interessierenden Genort umgebende Region. DNA-Polymorphismen zwischen den Bulks liegen mit größter Wahrscheinlichkeit in dieser Region, die als genetisches Fenster bezeichnet wird (Abb. 3.19). Als Resultat führt die BSA in der Marker-Analyse zu einer Fokussierung auf das interessierende Gen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die DNA von 10 F₂-Pflanzen die homozygot für das interessierende Gen waren zu gleichen Teilen in einem Reaktionsgefäß für die AFLP-Analyse vereinigt. Je 40 ng DNA jeder Pflanze wurden eingesetzt. Dies ergab bei 10 Pflanzen 400 ng DNA. Diese wurde der normalen AFLP-Prozedur unterzogen (siehe 2.9). Es wurde mit je zwei Zehner-Pools der rezessiven und der dominanten Genotypen gearbeitet, so dass insgesamt 40 F₂-Pflanzen in diese Analyse eingingen.

2.11.4 Einzelpflanzen-Analyse

AFLPs, die mit dem interessierenden Genort gekoppelt vorlagen, wurden weitergehend in den Elternlinien DGV und PF und in den F₂ Einzelpflanzen analysiert. Hierbei wurden F₂ Pflanzen analysiert, die am interessierenden Genort entweder homozygot dominant oder rezessiv waren. Die auftretenden Genotypen wurden wie folgt definiert:

1. Homozygot für das Allel des Wildtyp-Elter DGV:

“A”

2. Homozygot für das Allel des Mutanten-Elter PF:

“B”

3. Nicht homozygot für das Allel A (entweder der Genotyp BB oder AB)

“C”

4. Nicht homozygot für das Allel B (entweder der Genotyp AA oder AB)

“D”

5. Keine Angaben

“_“

Der Datensatz, welcher in den Programmen (siehe 2.11.5) analysiert, wurde ist im Anhang C. aufgeführt.

2.11.5 Zweipunkt-Rekombinationsfrequenz-Analyse

Es wurden zuerst die Zweipunkt-Rekombinationsfrequenzen (auch paarweise Rekombinationsfrequenzen) zwischen den Marker-Loci und dem *def*-Locus ermittelt.

Zweipunktanalysen zur Bestimmung der Rekombinationsfrequenzen zwischen jeweils zwei Loci zur Bestimmung wurden mit den Computerprogrammen MAPMAKER 3.0 (LANDER et al., 1987) und JoinMap 3.0 (VAN OIJEN und VOORRIPS, 2001) mit einem minimalen LOD³ von 3.0 durchgeführt. Rekombinationsfrequenzen wurden mit der Funktion von KOSAMBI (1944) berechnet. Es wurde dabei eine positive Crossing-over-Interferenz in distalen Chromosomenregionen angenommen (ESCH und WEBER, 2002).

2.11.6 Erstellung von Kopplungskarten

Multi-Punkt-Analysen zur Bestimmung von Rekombinationsfrequenzen einer Anzahl von Loci wurden mit den Computerprogrammen MAPMAKER 3.0 (LANDER et al., 1987) und JoinMap 3.0 (VAN OIJEN und VOORRIPS, 2001) mit einem LOD von 3.0 durchgeführt. Rekombinationsfrequenzen wurden mit der Funktion von KOSAMBI (1944) berechnet.

Aufgrund der Schwierigkeiten, die Rekombinationsfrequenzen für nebeneinander liegende, dominante Marker in Kopplungs- und Repulsions-Phase in F₂-Populationen auszuwerten, wurden für die in Repulsion vorliegenden Loci unabhängige Kopplungskarten erstellt (SÄLL und NILSSON, 1994; KNAPP et al., 1995). Das heißt, es wurden in einer Gruppe die AFLP-Loci mit der AFLP-Bande bei dem Wildtyp-Elter plus *def*-Locus und in einer zweiten Gruppe die AFLP-Loci mit der AFLP-Bande beim *def*-Mutanten-Elter plus *def*-Locus zusammengefasst und getrennt analysiert. Daraus ergaben sich eine Karte für die mit dem *def*-Wildtypallel des

³ Der LOD-Wert (Log of the odds) ist der decadische Logarithmus des Quotienten aus der Wahrscheinlichkeit für eine Kopplung und der Wahrscheinlichkeit für keine Kopplung (likelihood ratio) zweier Loci.

Elters DGV und eine für die mit dem *def*-Mutantenallel des Elters PF in Kopplung auftretenden Marker-Loci.

2.12 Differential Display Reverse Transkription PCR

Die "Differential Display Reverse Transkription PCR" (DDRT-PCR) wurde nach dem Protokoll des DDRT Primer Kit zur mRNA Display Amplifikation des Institut für Bioanalytik GmbH durchgeführt. Dies Protokoll wiederum basiert auf den Originalveröffentlichungen von LIANG und PARDEE (1992) und BAUER et al. (1993). An das Protokoll der "Random Amplified Polymorphic DNA" (RAPD, WILLIAMS et al., 1990) angelehnt, wird bei der DDRT-PCR eine PCR mit sehr niedriger Primerbindungs-Temperatur mit einem kurzen Decamer-Oligonucleotide und einem Poly-T-Primer durchgeführt. Als Matrizen-DNA wird cDNA, das heißt revers transkribierte mRNA eingesetzt.

2.12.1 Reverse Transkription

Die reverse Transkription erfolgte aus Gesamt-RNA in zwölf Reaktionen mit 12 verschiedenen 13 bp langen poly-T-Primern (sog. "Downstream"-Primern), die am 3'-Ende zwei selektive Nukleotide besitzen ($dT_{12}VN$, $V = dC, dG, dA$ und N ist dT, dC, dG und dA). 2 μ l RNA (0,1 - 0,2 μ g), 2 μ l "Downstream"-Primer (2,5 μ M) und 4 μ l H_2O_{reinst} wurden für 10 min bei 70°C inkubiert zur Denaturierung der RNA und auf Eis gekühlt. 4 μ l dNTP-Lösung (jedes Nukleotid 100 μ M), 4 μ l 5x Reverse-Transkriptase-Puffer, 2 μ l 0,1 M DTT wurden für drei min bei RT inkubiert. Dann wurde 1,5 μ l Reverse Transkriptase (Omniscript, Qiagen) zugefügt, 8 min bei RT und 60 min bei 35 °C inkubiert, 5 min auf 65 °C erhitzt, auf Eis gekühlt und 10 μ l H_2O_{reinst} zugegeben. Die Proben wurden bei - 20 °C gelagert.

2.12.2 Amplifikation

Zur Amplifikation der 12 cDNA-Proben wurden Mastermixe nach folgendem Schema angesetzt:

27 µl cDNA-Lösung

54 µl 10 x PCR-Puffer

15 µl dNTP-Lösung (10 mM)

13,5 µl Advan*Taq*-Polymerase (BD-Clontech, 0,5 U/µl)

54 µl "Downstream"-Primer (2,5 µM)

322,5 µl H₂Osteril

Je 18 µl Mastermix plus 2 µl eines der 26 verschiedenen Decamer-Oligonucleotide (sog. "Upstream"-Primer) wurden in einem 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäß vereinigt und für 30 sec bei 94 °C, 60 sec bei 40 °C, 30 sec bei 72 °C in 40 Zyklen amplifiziert.

2.12.3 Elektrophorese und Färbung der DDRT-PCR-Banden-Profile

Die Proben wurden in einem denaturierenden Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Silber angefärbt (siehe 2.7 und 2.8).

2.13 Enhanced Differential Display

Die "Enhanced Differential Display"-Analyse wurde dem Protokoll von LINSKENS et al. (1995) folgend durchgeführt. Die Methode unterscheidet sich von der DDRT-PCR im Wesentlichen durch

- a) die am 5'-Ende auf insgesamt 22 bp verlängerten Primer,
- b) ein verändertes PCR-Protokoll;

Im ersten Abschnitt wird in 4 Zyklen eine unspezifische Primerbindungstemperatur von 41 °C eingesetzt. Dies führt zu einer initialen Bindung von nur bis zu 10 Nukleotiden des Primer-3'-Endes mit komplementären cDNAs, die als Startpunkt der DNA-Synthese dienen. In den

nachfolgenden Zyklen wird jedoch der gesamte 5'-Primer inklusive des 5'-Überhanges kopiert. Im zweiten Abschnitt der PCR wird eine für den gesamten Primer stringente Bindungstemperatur von 60 °C gewählt. So wird bis auf die vier ersten Zyklen eine stringente und spezifische PCR durchgeführt (Abb. 3.7).

2.13.1 Reverse Transkription

In einem ersten Schritt wurde auch hier mit zwölf verschiedenen Poly-T-Primern, die in ihren zwei letzten 3'-Nukleotiden differieren, je eine reverse Transkription durchgeführt (dT₁₂VN, V= dC, dG, dA und N ist dT, dC, dG und dA). 1 µg RNA, 2,5 µl (20 µM) "Downstream"-Primer wurden auf final 12,5 µl mit H₂O_{reinst} aufgefüllt, für 10 min bei 75 °C denaturiert und auf Eis gekühlt. 1 µl RNasin (Pharmacia), 2,5 µl DTT (0,1 M), 2,5 µl dNTP-Lösung (0,25 mM) und 1 µl Reverse Transkriptase (SuperScript, Gibco-LifeTechnologies) wurden vereinigt und für 70 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 95 °C für 10 min beendet.

2.13.2 Amplifikation

1 µl der cDNA-Lösung aus der reversen Transkription, 2 µl 10 x PCR-Puffer, 2 ml dNTP-Lösung (0,2 mM), 1 µl des "Upstream"-Primers (20 pMol) und 0,5 µl AdvanTaq-Polymerase (BD-Clontech) wurden in einem 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäß gemischt und auf 20 µl mit H₂O_{reinst} aufgefüllt. Die Amplifikation mit den 20 verschiedenen "Upstream"-Primern erfolgt vier Zyklen mit 45 sec bei 94 °C, 41 °C für 60 sec und 72 °C für 60 sec. Dann folgten 18 Zyklen mit 45 sec bei 94 °C, 45 sec bei 60 °C und 120 sec bei 72 °C.

2.13.3 Elektrophorese und Färbung der EDD-PCR-Banden-Profile

Die Proben wurden im denaturierenden Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Silber angefärbt (siehe 2.7 und 2.8).

2.14 Supression Subtractive Hybridization

Die sog. “Supression Subtractive Hybridization” (SSH) wurde mit Veränderungen nach dem Protokoll CLONTECH PCR-Select cDNA Subtraction Kit User Manual (BD Clontech) und den Originalveröffentlichungen von GURSKAYA et al. (1996) und DIATCHENKO et al. (1996) durchgeführt. Das zugrundeliegende Prinzip der Methode ist eine Anreicherung differentiell exprimierter Transkripte durch eine subtraktive Nukleinsäure-Hybridisierung unter Ausnutzung des sog. PCR-Suppressions-Effektes (SIEBERT et al., 1995). Die Nukleinsäuren-Fraktion, die die spezifischen differentiell exprimierten Transkripte enthält, wird hier als “Tester” und die zu subtrahierende “Referenz”-Fraktion als “Treiber” bezeichnet.

Die Gesamt-RNA wurde mit Hilfe der SMART-Technologie (CHENCHIK et al., 1998) in cDNA umgeschrieben und in einer für sehr lange Amplifikate optimierten PCR mit geringer Zyklenanzahl amplifiziert.

Alle eingesetzten Chemikalien und Enzyme entstammen, soweit nicht anders vermerkt, dem CLONTECH PCR-Select cDNA Subtraction Kit (BD Clontech).

2.14.1 SMART-PCR-cDNA Synthese und Amplifikation

Durch Einsatz des SMART-Primers wird mRNA aus geringen Mengen von Gesamt-RNA mit höchstmöglicher Ausbeute und Qualität in doppelsträngige cDNA-Voll-Längen-Klone transkribiert (CHENCHIK et al., 1998). In einer angeschlossenen “Long-Distance”-PCR wird die daraus resultierende cDNA-Population mit geringer Zyklenanzahl, und damit möglichst genauem Erhalt der Relationen der einzelnen cDNA Klone zueinander, amplifiziert.

2.14.2 Reverse Transkription

Die reverse Transkription und alle weiteren Schritte bis zur Adapter-Ligation erfolgten parallel für die Tester- und Treiber-Nukleinsäuren. 1,1 µg Gesamt-RNA, 1 µl CDS-Primer (ein poly-T-Primer mit zusätzlichem 5'-Ende, 10 µM, BD-Clontech) und 1 µl SMART-Primer wurden mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ auf 5 µl aufgefüllt und für 2 min bei 70 °C denaturiert. 2 µl 5 x Erst-Strang-Puffer, 1 µl DTT (20 mM), 1 µl dNTP-Mix (10 mM) und 1 µl Reverse Transkriptase mit durch eine Punktmutation reduzierter RNase H-Aktivität (SuperScript II RT, GIBCO-LifeTechnologies)

wurden hinzugefügt und für eine Stunde bei 42 °C inkubiert. Die Proben wurden mit 40 µl TE (pH 7,6) verdünnt und zur Inaktivierung des Enzyms 2 min bei 72 °C erhitzt. Die cDNA wurde bei - 80 °C gelagert.

2.14.3 Long-Distance-PCR

Für jede "Long-Distance"- PCR wurde 1 µl der SMART-cDNA mit 10 µl 10 x PCR-Puffer, 2 µl dNTP-Mix (10 mM), 2 µl PCR-Primer, 2 µl Advantage 2 Polymerase Mix und H₂O steril auf 100 µl aufgefüllt. Die Proben wurden in den auf 95 °C vorgeheizten Thermocycler gestellt. Die PCR erfolgte 1 min bei 95 ° und anschließend 17 Zyklen 15 sec 95 °C, 65 °C 30 sec und 68 °C für 6 min. Die PCR wurde in einem Agarose-Gel überprüft und gegebenenfalls wurde die Zyklenanzahl optimiert. Die PCR-Produkte wurden über eine säulengebundene Matrix aufgereinigt (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen).

2.14.4 *Rsa* I Verdau

Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden mit dem Enzym *Rsa* I verdaut. 50 µl der aufgereinigten PCR, 10 µl 10 x *Rsa* I Puffer und 1,5 µl *Rsa* I-Enzym (10 U/µl) wurden auf 100 µl aufgefüllt und für 3 Stunden bei 37 °C inkubiert. Der Restriktionsverdau wurde mit 2 µl EDTA (0,5 M) gestoppt. Die Vollständigkeit des Verdau wurde in einem Agarose-Gel überprüft. Die DNA wurde über ein säulengebundene Matrix aufgereinigt (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen). Die Konzentration der DNA wurde im Spektrophotometer bei 260 und 280 nm bestimmt. Dann wurde die DNA mittels einer Ethanol fällung (SAMBROOK et al., 1989) präzipitiert und bis zu einer finalen Konzentration von 300 ng/µl in 1 x TNE-Puffer gelöst.

Die verwendeten Lösungen setzten sich wie folgt zusammen:

1 x TNE-Puffer:

10 mM Tris-HCl

10 mM NaCl

0,1 M EDTA, pH 8,0

2.14.5 Adapter-Ligation

Für die Adapter-Ligation wurde ein Hauptmix mit 3 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$, 2 μl 5 x Ligations-Puffer und 1 μl T4 DNA Ligase pro Reaktion vereinigt. Für jedes Adapter-Oligomer wurden 2 μl der verdauten Tester-cDNA, 2 μl des jeweiligen Adapters (10 μM) und 6 μl des Hauptmixes in einem 0,5 ml PCR-Reaktionsgefäß vermischt und $\ddot{\text{U}}\text{N}$ bei 16 $^\circ\text{C}$ inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 μl EDTA/Glycogen Mix und Erhitzung auf 72 $^\circ\text{C}$ für 5 min gestoppt.

2.14.6 Hybridisierung I

Die Hybridisierung I wurde für die beiden Adapter-Ligationen getrennt durchgeführt. Es wurden 1,5 μl der Treiber-cDNA, 1,5 μl der jeweiligen Tester-Adapter-Ligations-Reaktion mit 1 μl des 20 min auf 37 $^\circ\text{C}$ vorgewärmten 4 x Hybridisierungs-Puffers vermischt. Die Reaktionen wurden mit 40 μl Mineralöl überschichtet, 90 sec bei 98 $^\circ\text{C}$ denaturiert und anschließend für 8 Stunden bei 68 $^\circ\text{C}$ hybridisiert.

2.14.7 Hybridisierung II

Für die zweite Hybridisierung wurde 1 μl Treiber-cDNA, 1 μl 4 x Hybridisierungs-Puffer und 2 μl H_2O steril vereinigt, mit 40 μl Mineralöl überschichtet und für 90 sec bei 98 $^\circ\text{C}$ denaturiert. Nun wurde die Hybridisierungsreaktion I der einen Adapterligation in eine Mikropipette pipettiert, dann ein kleines Volumen Luft aufgezo-gen, der frisch denaturierte Driver aufgezo-gen und die beiden durch eine schmale Luftschicht getrennten Proben in das Reaktionsgefäß der Hybridisierungsreaktion der anderen Adapterligation überführt, so dass dort ein simultanes Vermischen der drei verschiedenen Lösungen erfolgen konnte. Die Hybridisierung II wurde $\ddot{\text{U}}\text{N}$ bei 68 $^\circ\text{C}$ durchgeführt.

200 μl Verdünnungspuffer wurden dazugegeben, für weitere 7 min wurde bei 68 $^\circ\text{C}$ inkubiert und dann wurde die Lösung bei - 20 $^\circ\text{C}$ gelagert.

2.14.8 PCR I

Für die PCR I wurde 1 µl der Hybridisierungslösung II mit 2,5 µl 10 x PCR-Puffer, 0,5 µl dNTP-Gemisch (10 mM), 1 µl PCR Primer 1 (10 mM) und 0,5 µl 50 x Advantage cDNA Polymerase Mix in einem 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäß vereinigt und mit H₂O_{reinst} auf 25 µl aufgefüllt. Das Reaktionsgemisch wurde zur Auffüllung der Adapter-Einzelstrangsequenzen für 5 min bei 75 °C inkubiert. Dann erfolgte eine PCR mit 27 Zyklen a 30 sec 94 °C, 30 sec 66 °C und 90 sec 72 °C.

2.14.9 Nested-PCR

Es wurde eine zweite PCR mit zwei Primern durchgeführt, die weiter innerhalb am 3' Ende der Adapter binden. Solch eine PCR mit einem zweiten Paar spezifischer Primer führt zu einer Reduktion möglicher unspezifischer Hintergrund-Amplifikate aus der ersten PCR.

3 µl der PCR I wurden mit H₂O_{reinst} auf 30 µl aufgefüllt. 1 µl dieser Verdünnung, 2,5 µl 10 x PCR-Puffer, je 1 µl der beiden "Nested"-Primer (10 µM), 0,5 µl dNTP-Gemisch (10 µM) und 0,5 µl 50 x Advantage cDNA Polymerase Mix wurden in einem 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäß vereinigt und auf 25 µl mit H₂Osteril aufgefüllt. Die PCR wurde 11 Zyklen a 30 sec 94 °C, 30 sec 68 °C und 90 sec 72 °C durchgeführt. Sowohl die PCR I als auch die "Nested" PCR wurden in einem Agarose-Gel überprüft.

Die "Nested" PCR enthält die in der SSH differentiell angereicherten cDNA-Fragmente.

2.14.10 Klonierung der SSH

3 µl der "Nested"-PCR-Lösung wurden direkt in den T/A-Klonierungsvektor pGEM-T-Easy (Promega) kloniert und anschließend in chemisch kompetente *E. coli* Bakterien des Stammes "TOP10F" OneShot" (Invitrogen) transformiert. Über ein Blau/Weiß-Screening wurden die rekombinante Vektoren tragenden Bakterien-Kolonien selektiert. Für die SSH-cDNA-Bibliothek ausgewählte Klone wurden ÜN in 90 µl LB plus 10 µl 10 x HMFM-Medium ("Hogness Modified Freezing" Medium) in Mikrotiterplatten angezogen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei - 80 °C gelagert.

Die verwendeten Lösungen setzten sich wie folgt zusammen:

10 x HMFM-Medium:

4/5 Lösung A plus 1/5 Lösung B

Lösung A:

5 mM Magnesiumsulfat

20 mM Natriumcitrat

85 mM Ammoniumsulfat

45 % Glycerin

Lösung B:

0,66 M KH₂PO₄

1,3 M K₂HPO₄

2.15 Hybridisierungen zur Überprüfung differentieller Expression

Zur Verifikation möglicher differentiell exprimierter Klone wurden verschiedene Hybridisierungen, sog. "Dot Blots", "Reverse Virtual Northern Blots" und "Virtual Northern Blots", die alle auf der Methode von SOUTHERN (1975) basieren, durchgeführt. Dabei wird entweder die Gesamt-cDNA auf einer Membran fixiert und mit der markierten Sonde eines Kandidaten-Klons hybridisiert oder aber der Kandidaten-Klon auf der Membran fixiert und mit der Gesamt-cDNA hybridisiert (reverser Blot). Es wurde nicht mit RNA gearbeitet, sondern mit SMART-cDNA, die auf einer möglichst exakten Transkription der mRNA in cDNA basiert (virtueller Northern, DIATCHENKO et al., 1998; CHENCHIK et al., 1998; ENDEGE et al., 1999).

2.15.1 PCR der cDNA Klone

Bakterien-Klone der SSH-cDNA-Bibliothek wurden in 100 µl LB-Ampicillin-Medium für drei Stunden angezogen. Die Plasmid-Insertionen der cDNA-Kandidaten-Klone wurden durch eine PCR ohne vorherige Plasmid-Präparation amplifiziert. Hierbei wurde 1 µl der Bakterienkultur, 2 µl 10 x PCR-Puffer, je 0,5 µl der zwei "Nested"-Primer, 0,5 µl dNTP-Mix (10 mM), 1 µl RedTaq-Polymerase und 13,5 µl H₂O_{reinst} zusammenpipettiert und 23 Zyklen a 10 sec 95 °C und 3 min 68 °C mit einer vorgeschalteten Denaturierung zum Aufschluss der Bakterienzellen bei

95 °C für 1 min amplifiziert.

2.15.2 Reverse Dot Blot

Es wurde ein differentielles Dot Blot Screening nach dem “CLONTECH PCR-Select Differential Screening Kit User Manual” (BD Clontech) durchgeführt. Hierbei werden die amplifizierten Kandidaten-cDNA-Klone auf eine Membran aufgetropft (Dot Blot) und gegen markierte Gesamt-SMART-cDNA und SSH-cDNA von Tester und Treiber hybridisiert. Die Erwartung ist, dass differentiell exprimierte Kandidaten-Klone stärker mit Tester SMART-cDNA und Tester SSH-cDNA hybridisieren als mit Treiber-cDNA und Treiber SSH-cDNA. Die PCR-Lösung wurde zur DNA-Denaturierung mit 1 Volumen 0,6 M NaOH vermischt. 2 µl dieser Lösung wurden mit einer Mikro-Multipipette nacheinander auf vier Nylon Membranen getropft. Die Membranen wurden für 3 min in 0,5 M Tris-Puffer (pH 7,5) neutralisiert, kurz in H₂O_{reinst} gewaschen und für 30 min bei 120 °C gebacken.

2.15.2.a Hybridisierung

Jeweils eine der vier erstellten Membranen wurden parallel mit einer der vier cDNA-Sonden aus 2.15.4 hybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte wie beschrieben (siehe 2.16) .

2.15.3 Reverse Virtual Northern Blot

Es wurde ein reverser Virtual Northern Blot durchgeführt. Hierbei wurden die amplifizierten Kandidaten-cDNA-Klone im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und gegen markierte Gesamt-SMART-cDNA und SSH-cDNA von Tester und Treiber hybridisiert. Die Erwartung ist, dass differentiell exprimierte Kandidaten-Klone stärker mit Tester SMART-cDNA als mit der Driver SMART-cDNA hybridisieren.

Je 4 µl der PCR-Reaktionen wurden parallel in zwei 1,5 % Agarose-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt, mit Ethidiumbromid angefärbt, 2 x 15 min in Denaturierungslösung inkubiert, 10 min in Neutralisierungslösung inkubiert und ÜN mittels Kapillartransfer in 20 x SSC-Puffer (Zusammensetzung der Lösungen siehe 2.16) auf Nylon-Membranen übertragen. Die Membranen wurde zur Fixierung der DNA für 30 min bei 120 °C gebacken.

2.15.3.a Hybridisierung

Es wurde parallel eine Hybridisierung gegen die SMART-cDNA-Sonde der 46A und der DGV durchgeführt. Die Hybridisierung erfolgte wie beschrieben (siehe 2.16).

2.15.4 Herstellung der cDNA-Sonden mittels Zufallsprimer-Markierung

In einer "Long-Distance"-PCR amplifizierte SMART-cDNA und in der "Nested"-PCR amplifizierte differentiell angereicherte SSH-cDNA wurden mit dem DIG-DNA Labeling and Detection Kit (Roche Diagnostics) markiert und als Sonden eingesetzt.

SMART-cDNA und SSH-cDNA von Tester und Driver wurden mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt. Die DNA-Konzentration wurde im Spektrophotometer bei 280 und 260 nm bestimmt. Für die Markierungsreaktion wurden je 2000 ng cDNA in 15 µl Volumen gelöst, für 10 min im kochenden Wasserbad denaturiert und auf Eis schockgekühlt. Es wurden je 2 µl Hexanucleotide-Mix und dNTP-Mix und 1 µl Klenow-Enzym dazupipettiert. Das Gemisch wurde für eine maximale Ausbeute 20 Stunden bei 37 °C inkubiert.

2.15.4.a Abschätzung der Markierungseffizienz

Die Markierungseffizienz wurde in einem Vergleich von verschiedenen Verdünnungen der markierten Sonden mit einer markierten Kontroll-DNA abgeschätzt. Je 1 µl einer Verdünnung mit 100, 10, 1, 0,1, sowie 0,01 pg/µl der Kontroll-DNA wurden auf eine Nylonmembran aufgetropft. Parallel dazu wurden je 1 µl von Verdünnungsstufen der markierten Sonden aufgetropft, welche nach Abwägung der Menge der eingesetzten DNA und der Dauer der Markierungsreaktion etwa die gleiche Konzentration an markierter DNA erwarten ließen. Die Membran wurde durch Exposition auf dem UV-Transilluminator für 2 min fixiert. Die Membran wurde kurz in Waschlösung gespült, für 30 min in Blocklösung und anschließend 30 min in Anti-DIG-AP-Lösung : Blocklösung 1 : 5000 inkubiert. Dann wurde die Membran zweimal 10 min in Waschlösung gespült, zwei min in Detektionspuffer equilibriert und in 10 ml Detektionspuffer plus 45 µl NBT-Lösung plus 35 µl BCIP-Lösung ohne Schütteln in der Dunkelheit für 1 Stunde inkubiert. Die Intensität der Schwärzung der aufgetropften markierten DNA-Verdünnungen wurde zur Schätzung der Markierungseffizienz genutzt.

2.15.5 Virtual Northern Blot

Die Virtual Northern Blot-Analyse ist vergleichbar mit einem klassischen Northern Blot. Es wird SMART-cDNA, die möglichst exakt der mRNA entspricht, elektrophoretisch im Agarosegel aufgetrennt, geblottet und mit markierten Kandidaten-cDNA-Klonen hybridisiert.

Für die Virtual Northern Blot-Analyse wurden 40 µl einer in einer Long-Distance-PCR amplifizierten SMART-cDNA (siehe 2.14.3) des Treibers und des Testers in einem 1,2 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, dokumentiert, 2 x 15 min in Denaturierungslösung inkubiert, 10 min in Neutralisierungslösung inkubiert und in einem Kapillarblot mit 20 x SSC-Puffer (Zusammensetzung der Lösungen siehe 2.16) auf Nylonmembran übertragen. Die Membran wurde zur Fixierung der DNA für 30 min bei 120 °C gebacken.

2.15.5.a Herstellung von Kandidaten-cDNA-Klon-Sonden mittels PCR-Markierung

Einzelne Klone der SSH-cDNA-Bibliothek wurden in einer PCR mit dem PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche Diagnostics) markiert und mit der Membran hybridisiert.

Bakterien-Klone der SSH-cDNA-Bibliothek wurden in 100 µl LB-Ampicillin-Medium für drei Stunden angezogen. 1 µl der Kulturlösung wurde als Matrize in die PCR eingesetzt. 5 µl 10 x PCR-Puffer, je 1 µl der zwei "Nested"-Primer, 2,5 µl des PCR DIG Probe Synthesis Mix (2 mM dATP, 2 mM dCTP, 2 mM dGTP, 1,3 mM dTTP, 0,7 mM alkali-labiles DIG-11-dUTP, pH 7,0), 2,5 µl dNTP-Mix (2 mM), 1 µl "High-Expand"-DNA-Polymerase-Mix wurden dazupipettiert und das finale Volumen mit H₂O steril auf 50 µl aufgefüllt. Die Reaktion wurde in 23 Zyklen a 10 sec 95 °C und 3 min 68 °C mit einer vorgeschalteten Denaturierung zum Aufschluss der Bakterienzellen bei 95 °C für 1 min amplifiziert unter Einbau des DIG-Moleküls.

2.15.5.b Abschätzung der Markierungseffizienz

Um unspezifische PCR-Nebenprodukte auszuschließen und um die Effizienz der Markierung abzuschätzen, wurde die Reaktion in einem 1,2 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Dabei wurde parallel ein aliquot des gleichen PCR-Produktes einer Kontroll-PCR ohne DIG-Molekül-Einbau aufgetragen. Die markierte DNA läuft in dem Gel aufgrund ihres durch den Einbau des DIG-Moleküles höheren Molekulargewichtes je nach Effizienz des Einbaues langsamer als die unmarkierte Kontroll-DNA.

2.15.5.c Aufreinigung der markierten DNA

Die markierte PCR-Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) aufgereinigt.

2.15.5.d Hybridisierung

Die mittels PCR markierten Einzel-cDNA-Klone wurden mit der Virtual Northern Blot Membran hybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte wie beschrieben (siehe 2.16).

2.16 DNA-DNA Hybridisierung

Die Hybridisierungen von markierter Einzelstrang-DNA in Lösung mit Einzelstrang-DNA fixiert auf Nylonmembran wurde im wesentlichen dem Protokoll des sog. DIG System User's Guide for Filter Hybridization (Roche Diagnostics) folgend durchgeführt. Als Prähybridisierungs- und Hybridisierungslösung wurde DIG-Easy-Hyb (Roche Diagnostics) verwendet. Die Membranen wurden für 2 Stunden zur Prähybridisierung in Glas-Hybridisierungsröhrchen mit 10 - 20 ml DIG-Easy Hyb (je nach Größe der Membran) bei 42 °C im Hybridisierungsöfen mit Rotordrehung inkubiert. Die markierte DNA wurde für 10 min im kochenden Wasserbad denaturiert, auf Eis schockgekühlt und anschließend zu der Prähybridisierungslösung dazupipettiert. Die Hybridisierung erfolgte ÜN bei 42 °C. Die Membran wurde 2 x 10 min mit 2 x SSC/0,1 % SDS-Lösung bei RT und 2 x 15 min mit 0,5 x

SSC/0,2 x SSC-Lösung bei 68 °C gewaschen.

2.16.1 Antikörperbindung

Es erfolgte eine kurze Equilibrierung in Waschpuffer und eine Inkubation für 30 min in Block-Lösung (Roche Diagnostics). Anschließend wurde die Membran für die Antikörperbindung an das DIG-Molekül für 30 min mit Anti-DIG-AP-Lösung (Roche Diagnostics) : Blocklösung 1 : 20 000 inkubiert und dann für 2 x 15 min mit Waschlösung gewaschen.

2.16.2 Detektion der Chemiluminescence

Es folgte ein Equilibrierung in Detektionspuffer für 4 min. Die Membran wurde zwischen eine aufgeschnittene Kunststoff-Schutzhülle für DIN-A4-Materialien gelegt. Es wurden 250 - 1000 µl (je nach Membrangröße) einer 1: 100 DEA-Lösung : CDP-Star-Lösung (Roche Diagnostics) aufgetropft, die geöffnete Folie auf die Membran gelegt und die Lösung blasenfrei zwischen Folie und Membran verteilt. Nach 1 min wurde überschüssige Flüssigkeit zwischen den Folienschichten und der Membran mit Papiertüchern seitlich herausgewischt. In der Dunkelkammer wurde ein Biomax-Luminescence-Film (Kodak) je nach Signalstärke für 10 sec bis zu 60 min aufgelegt und anschließend entwickelt.

Die verwendeten Lösungen setzten sich wie folgt zusammen:

Denaturierungslösung:

0,5 M NaOH

1,5 M NaCl

20 x SSC-Puffer:

3 M NaCl

0,3 M Na-Citrat

pH 7,0

Neutralisierungslösung:

0,5 M Tris-HCl

3 M NaCl

pH 7,5

Maleinsäure-Puffer:

0,1 M Maleinsäure

0,15 M NaCl

pH 7,5

Waschlösung:

Maleinsäure-Puffer
0,3 % (w/v) Tween 20

Detektionspuffer:

100 mM NaCl
100 mM Tris-HCl
pH 9,5

DEA-Lösung:

100 mM DEA
1 mM MgCl₂

2.17 Sequenzanalyse

DNA-Klone wurden nach der Sanger-Methode sequenziert (SANGER, 1977; MWG-Biotech oder IPK Gatersleben/Pea EST-Project). Alle Sequenzen sind in die "Pea EST Database" des IPK-Gatersleben aufgenommen worden (<http://gw-12.ipk-gatersleben.de/cgi-bin/peaDB.cgi>). Die Sequenzen wurden nach Entfernung von Vektor- und SSH-Adapterbereichen auf Homologien zu vorhandenen Sequenzdaten der vom National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) bereitgestellten Datenbanken mit dem Programm BLAST (ALTSCHUL et al., 1997) verglichen.

Dabei wurden bis zu 3 Suchen durchgeführt:

1. Homologie-Vergleich zu allen Nukleinsäuresequenzen exklusive EST-Sequenzen (BLAST/Nucleotide BLAST/Standard nucleotide-nucleotide BLAST/nr).
2. Homologie-Vergleich zu allen EST-Sequenzen (BLAST/Nucleotide BLAST/Standard nucleotide-nucleotide BLAST/est).
3. Translation der Nukleinsäure-Sequenz in die 6 möglichen ORFs und Homologie-Vergleich zu vorhandenen Proteinsequenzen (BLAST/Translated BLAST Searches/ Nucleotide query-Protein db).

Die NCBI-Nukleinsäure-Datenbank setzt sich zusammen aus Sequenzdaten:

1. der NCBI-GenBank,
2. des European Molecular Biology Laboratory (EMBL),

3. der DNA Database of Japan (DDBJ)
4. der Genome Sequence Data Base (GSDB).

Die NCBI-Proteinsequenz-Datenbank setzt sich zusammen aus Sequenzdaten:

1. der NCBI-GenBank
2. des European Molecular Biology Laboratory (EMBL),
3. der DNA Database of Japan (DDBJ),
4. des Protein Information Resource (PIR),
5. dem SWISSPROT,
6. der Protein Research Foundation (PRF),
7. der Protein Data Bank (PDB).

3. Ergebnisse

3.1 Ergebnisse zur Analyse des *Late Flowering*-Locus

3.1.1 Untersuchungen zum Blühverhalten verschiedener *Lf*-Genotypen

Bei den verschiedenen Aussaaten zu unterschiedlichen Jahreszeiten konnte eine starke Variation des Blühbeginns in Abhängigkeit von den äußeren Bedingungen festgestellt werden. In zwei Aussaaten im Frühjahr und im Winter blühten die spätblühenden DGV-Pflanzen nach 41 Tagen oder aber erst nach 48 Tagen, die frühblühenden 46A nach 28 oder erst nach 33 Tagen.

DGV-Pflanzen blühten minimal ab dem 13. Nodus. Die 46A-Pflanzen blühten minimal ab dem 5. Nodus. Dies steht in Übereinstimmung mit den Beobachtungen von TAYLOR und MURFET (1993) bezüglich der für DGV und 46A festgestellten Allelklassen *Lf* und *lfa*.

Für eine Aufspaltungs-Analyse interessierender Loci wurde DGV, homozygot für das Wildtyp *LF*-Allel mit 46A, homozygot für das mutierte *lfa*-Allel, gekreuzt.

Die Handkreuzung führte in ca. 50 % der Fälle zu einer erfolgreichen Blüte mit jedoch stark reduzierter Anzahl von Samen pro Frucht. So konnten nach 64 durchgeführten Handbestäubungen 33 ausgereifte F1-Samen geerntet werden.

Die F1-Generation wurde parallel zu DGV- und 46A-Kontrollpflanzen angezogen (Aussaattermin Mitte März). Die F1-Pflanzen zeigten bezüglich des Blühbeginns ein eindeutiges intermediäres Verhalten. So blühten sie nach 35 Tagen ab dem 13. Nodus, während die 46A-Pflanzen ab dem 6. Nodus nach 28 Tagen und die DGV-Pflanzen erst ab dem 16. Nodus nach 41 Tagen blühten.

Auch die F2 wurde parallel mit Eltern-Pflanzen aufgezogen (Aussaattermin 10. Januar). Hier konnte jedoch der heterozygote *Lf/lfa*-Genotyp nicht mehr eindeutig von dem homozygoten *LfLf*-Genotyp unterschieden werden und das mutierte *lfa*-Allel verhielt sich wie ein eindeutig rezessives Allel. Die Ausprägung des heterozygoten Genotyps in intermediärer Form wird also

bei kühleren Temperaturen (Maximum $< 20\text{ }^{\circ}\text{C}$) und kürzerer Tageslichtlänge (< 11 Stunden) nicht eindeutig ausgeprägt (Tab. 3.1, Abb. 3.1).

Tab. 3.1: Aussaaten der Eltern-, F1- und F2-Generation und Zeitpunkt der 1. Blüte

Pflanzen	Aussaattermin	Datum 1. Blüte	Tage bis 1. Blüte	min. Nodus 1. Blüte
DGV	24.11.1998	11.01.1999	48	16
46A	07.12.1998	09.01.1999	33	5
DGV	16.03.1999	26.04.1999	41	16
46A	16.03.1999	13.04.1999	28	6
F1	16.03.1999	20.04.1999	35	13
F2	10.01.2001	12.03.2001	29	5

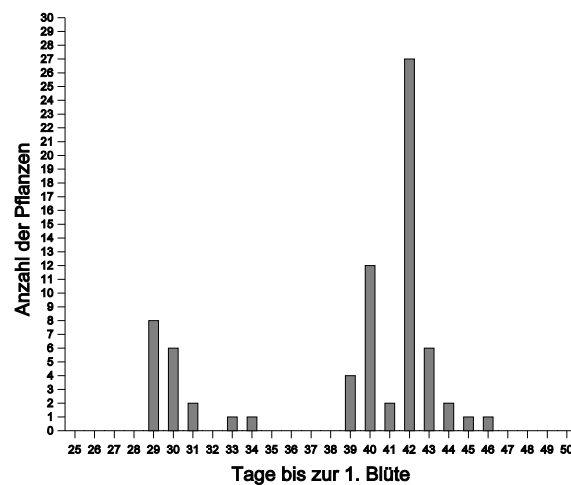


Abb. 3.1: Diagramm der Verteilung der F2-Pflanzen betreff des Zeitpunktes der 1. Blüte zur Verdeutlichung a) der klaren Zweiteilung in früh- und spätblühende Pflanzen und b) des Fehlens einer abgegrenzten intermediären Blüte der Heterozygoten.

Homozygote Träger des *lfä*-Allels konnten jedoch immer eindeutig von den anderen Klassen unterschieden werden. Der *Chi*-Quadrat-Wert der Aufspaltung der F2-Generation war

signifikant bei 5 %igem Fehler erster Art (siehe Tabelle 3.2).

Tab. 3.2: Aufspaltung der F2-Population

	Spätblühend (Lf/x)	Frühblühend (lfa/lfa)	Gesamt
beobachtet	58	19	77
erwartet	57,75 (3/4 vom Gesamt)	19,25 (1/4 vom Gesamt)	77
chi-Quadrat	0,0011	0,0034	0,0044
df	1		

3.1.2 Analyse differentieller Expression bei DGV und 46A

Auf der Transkriptomebene wurden Unterschiede gesucht, die im Zusammenhang mit der Initiation der Blüte stehen. Um detektierte Unterschiede auf diesen Blühbeginn begrenzen zu können, wurden die Mutante 46A und ihr Wildtyp DGV eingesetzt, die sich nur am *Late Flowering Locus* unterscheiden. DGV ist homozygoter Träger des spätblühenden *Lf*-Allels und 46A homozygoter Träger des frühblühenden *lfa*-Allels.

Für die Analyse differentieller Expression wurde RNA 10 - 16 Tage alte gleichzeitig angezogener Spross-Apices der Mutante 46A und des Wildtyp DGV verwendet. Apices wurden parallel von DGV- und 46A-Pflanzen zu dem Zeitpunkt präpariert, an dem unter dem Binokular bei 15facher Vergrößerung bei der frühblühenden Mutante 46A die ersten Blühmeristeme sichtbar wurden, während bei DGV noch der vegetative Zustand des Spross-Apikal-Meristems vorlag (Abb. 3.2). Mit der Blüteninitiation wird der Spross-Apex etwas breiter durch die zusätzlich angelegten Blühmeristeme und ist so schon an der äußeren Form gut von dem länglicheren vegetativen Spross-Apex zu unterscheiden. Nimmt man weitere Schichten der Sprossknospe ab, werden bei der 46A die Blütenknospen sichtbar (Abb. 3.3).

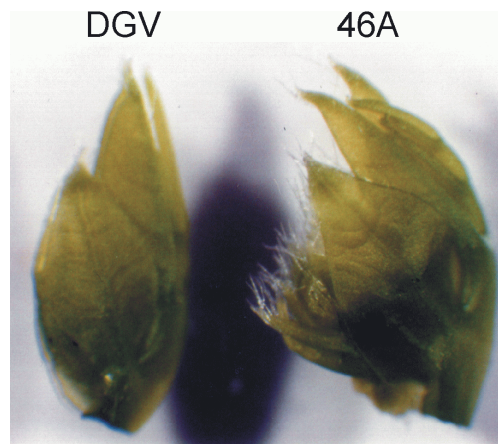


Abb. 3.2: Präparierte Sprossknospen des Wildtyps DGV und der frühblühenden Mutante 46A. Die schlankere, vegetative Form ist gut von der breiteren Form der die Blüte ausbildenden 46A zu unterscheiden. Vertikale Länge der Knospen ca. 3 mm

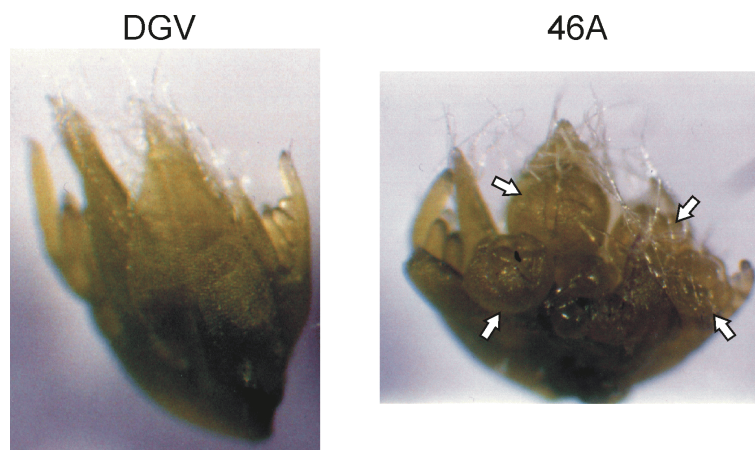


Abb. 3.3: Präparierte Sprossknospen mit freigelegten Blühmeristemen (Pfeile) bei der frühblühenden 46A, während beim Wildtyp DGV nur vegetative Organe angelegt sind. Vertikale Länge der Knospen ca. 1 - 1,5 mm

Der unterschiedlich gewählte Zeitpunkt für die RNA-Isolierung beruhte auf der jahreszeitlichen Schwankung im Wachstums- und Blüh-Verhalten der Pflanzen. Der intakte Zustand der isolierten RNA wurde im Gel überprüft (Abb. 3.4).

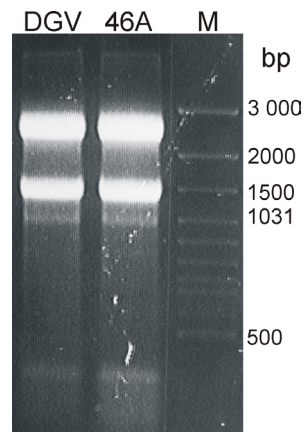


Abb. 3.4: RNA-Qualitäts-Check im Agarosegel
Je 1 μg Gesamt-RNA von DGV und 46A wurden im denaturierenden Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und auf Intaktheit überprüft. M: 100 bp Leiter+ (Größenverhältnis von der RNA zum DNA-Marker ist aufgrund des unterschiedlichen Laufverhaltens verzerrt).

3.1.2.a Expressionsanalyse mit der DDRT-PCR

Als erste Methode zur Analyse differentieller Transkription zwischen der Mutante 46A und dem Wildtyp DGV wurde eine “Differential Display Reverse Transkription PCR” (DDRT-PCR) durchgeführt (Abb. 3.5, siehe 2.12).

Aus RNA von DGV und 46A wurden mit den verschiedenen poly-T-Primern 12 cDNA-Fraktionen gewonnen. Jede dieser cDNA-Fraktionen wurde wiederum in PCRs mit 26 verschiedenen Zufallsprimern eingesetzt, so dass insgesamt 312 PCR-Profile amplifiziert und zwischen DGV und 46A verglichen wurden (Abb. 3.6).

Die amplifizierten Banden waren kleiner als 1.000 bp und größer als 80 bp. In jeder Primerkombination wurden spezifische Fragmente amplifiziert. PCRs, welche mit cDNA eines poly-T-2-plus Primers durchgeführt wurden, wiesen jedoch immer auch übereinstimmende Banden bei verschiedenen Zufallsprimern auf. Ungefähr 10 - 30 PCR-Amplifikate zeigten bei der Silberfärbung eine starke Schwärzung, die ihre Visualisierung distinkt und reproduzierbar machte. Bis zu 60 weitere Banden pro Reaktion setzten sich jedoch nur schwach von der Hintergrundfärbung ab. Insgesamt waren die Banden relativ diffus und unscharf. Ein hohes Maß

an Übereinstimmung der Banden-Profile von DGV und 46A war ein Indiz für einen vergleichbaren Zustand der Ausgangs-RNA, und eine vergleichbare Verarbeitung in der reversen Transkription und in der PCR. Im geschätzten Durchschnitt wurden pro PCR-Profil ca. 20 Banden analysiert. Daraus ergibt sich insgesamt eine Anzahl von etwas mehr als 6.200 analysierten Banden.

Im Vergleich des Wildtyps und der 46 A konnten in den 312 analysierten Primerkombinationen keine Unterschiede bei den oben genannten Amplifikaten mit starker Anfärbung festgestellt werden. Nur bei den schwach sichtbaren und unscharfen Banden konnten Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante beobachtet werden (Abb. 3.6) . Diese Unterschiede wurden jedoch aufgrund ihrer geringen Eindeutigkeit nicht weitergehend analysiert.

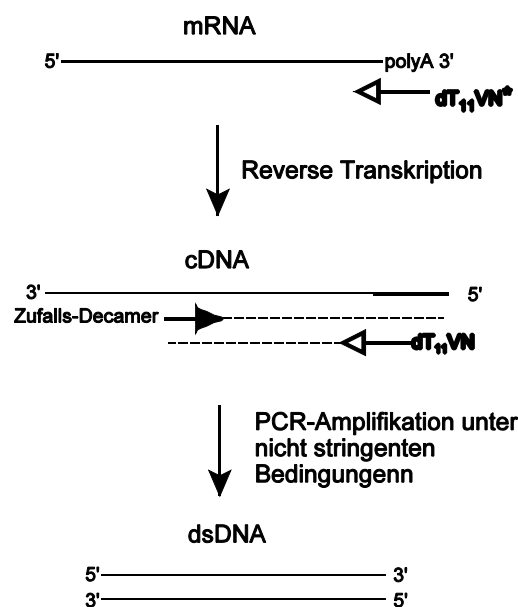


Abb. 3.5: Schema der DDRT-PCR

cDNA aus reverser Transkription mit 12 verschiedenen Poly-T-Plus2-Primern dient als Matrize für PCRs mit 26 verschiedenen Decamer-Zufalls-Primern, 12 verschiedenen Poly-T-Primern und niedrigen nicht stringenten Primer-Bindungs-temperaturen;
 * V = dG, dC, dA, N = dC, dT, dG, dA

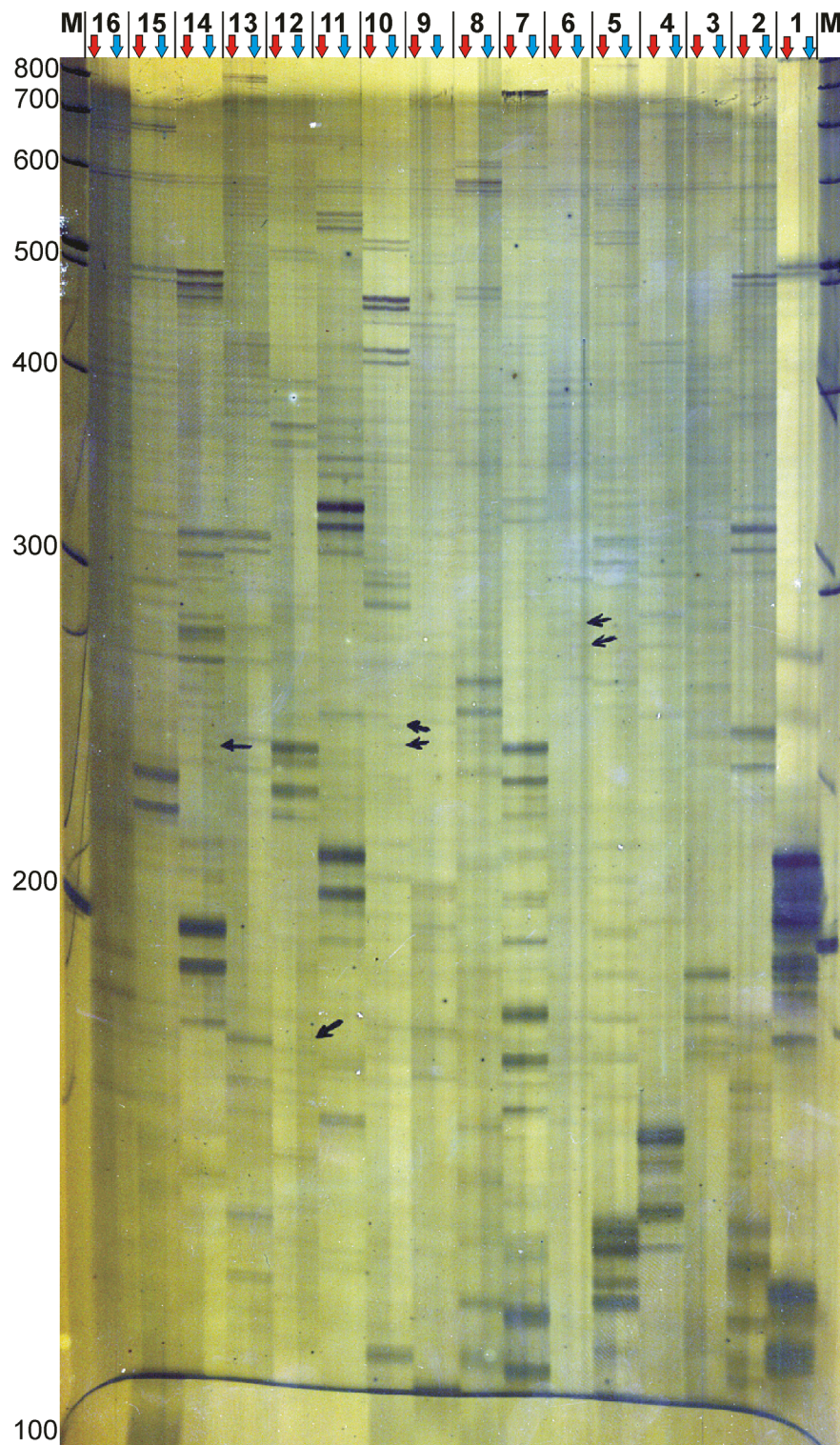


Abb. 3.6: Beispiel einer DDRT-PCR

Im Polyacrylamidgel wurden die Bandenmuster aus Reaktionen mit dem Poly-T-Primer "D4" und von rechts nach links den Zufallsprimern 1 - 16 aufgetrennt. Die linke Spur jeder Primerkombination geht auf 46A (rote Pfeile), die rechte auf DGV (blaue Pfeile) zurück. Leichte Unterschiede einiger Banden zwischen 46A und DGV, die in der Reproduktion jedoch kaum zu erkennen sind, werden durch schwarze Pfeile markiert. M: Längenstandard 100 bp-Leiter "plus"

3.1.2.b Expressionsanalyse mit der EDD-PCR

Die Analyse differentieller Expression zwischen DGV und 46A wurde mit einer optimierten Variante des Differential Display, der “Enhanced Differential Display”-Analyse (EDD, LINSKENS et al, 1995) fortgesetzt, da in der vorangegangenen DDRT-PCR (siehe 3.12.a) keine signifikanten Unterschiede in den Bandenmustern gefunden werden konnten.

Die entscheidenden Unterschiede der EDD zur DDRT-PCR sind die verlängerten Primern und die PCR, die sich in 4 initiale Zyklen mit niedriger Primerbindungstemperatur und 18 Zyklen mit erhöhter, für die Primer stringenter Bindungstemperatur gliedert (siehe 2.13 und Abb. 3.8).

Als Ausgangsmaterial wurde RNA von DGV und 46A (3.1.2) eingesetzt.

Mit 12 3'-Primern und 20 5'-Zufallsprimern wurden insgesamt 240 PCR Profile amplifiziert und zwischen dem Wildtyp und der Mutante verglichen. In der in der vorliegenden Arbeit zum ersten mal beschriebenen Kombination von EDD und Silberfärbung führte die EDD zu deutlich besseren Resultaten als die DDRT-PCR (Abb. 3.8 & Abb. 3.6). Die amplifizierten DNA-Banden waren kleiner als 1.000 bp und größer als 80 bp. In jeder Primerkombination wurden spezifische Fragmente amplifiziert. Im Gegensatz zu der DDRT-PCR wurden bei PCRs mit gleichem 5'- aber unterschiedlichem 3'-Primer nur in Ausnahmen übereinstimmende Banden amplifiziert. Weiterhin war ein Großteil der Banden weniger diffus und setzte sich deutlicher von der Hintergrundfärbung ab. Es wurden ca. zwischen 20 und 100 auswertbare Banden pro PCR-Profil amplifiziert mit einem Durchschnitt von ca. 45 Banden pro PCR-Reaktion.

Es wurden insgesamt knapp 11.000 distinkte Banden zwischen dem Wildtyp DGV und der Mutante 46A verglichen. Dabei konnten jedoch keine eindeutigen Unterschiede festgestellt werden. Einige Unterschiede in der Intensität der Anfärbung konnten in Wiederholungen nicht bestätigt werden.

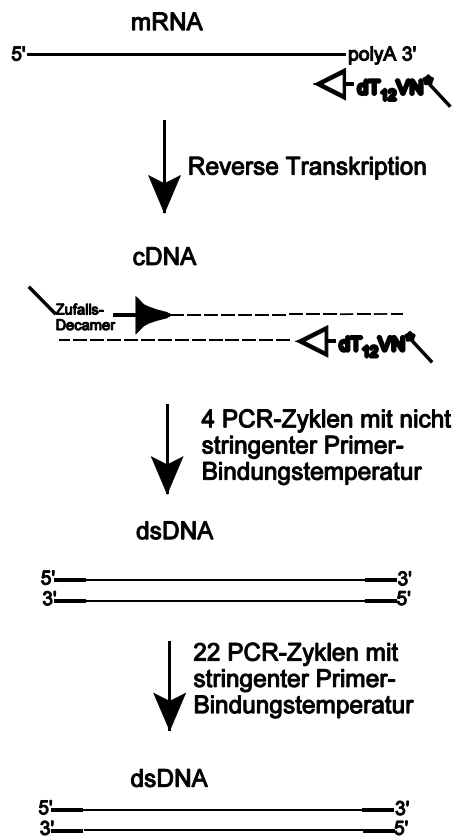


Abb. 3.7: Enhanced Differential Display (EDD) Schema; 5'- und 3'-Primer enthalten am 5'-Ende 8 zusätzliche Nukleotide. Nach 4 unspezifischen Zyklen mit einer Bindungstemperatur von 41 °C, die zu einer Kopie der Sequenzen inklusive der überhängenden 5'-Enden führt, werden 22 spezifische Amplifikationen angeschlossen; * V = dG, dC, dA, N = dC,dT, dG, dA;

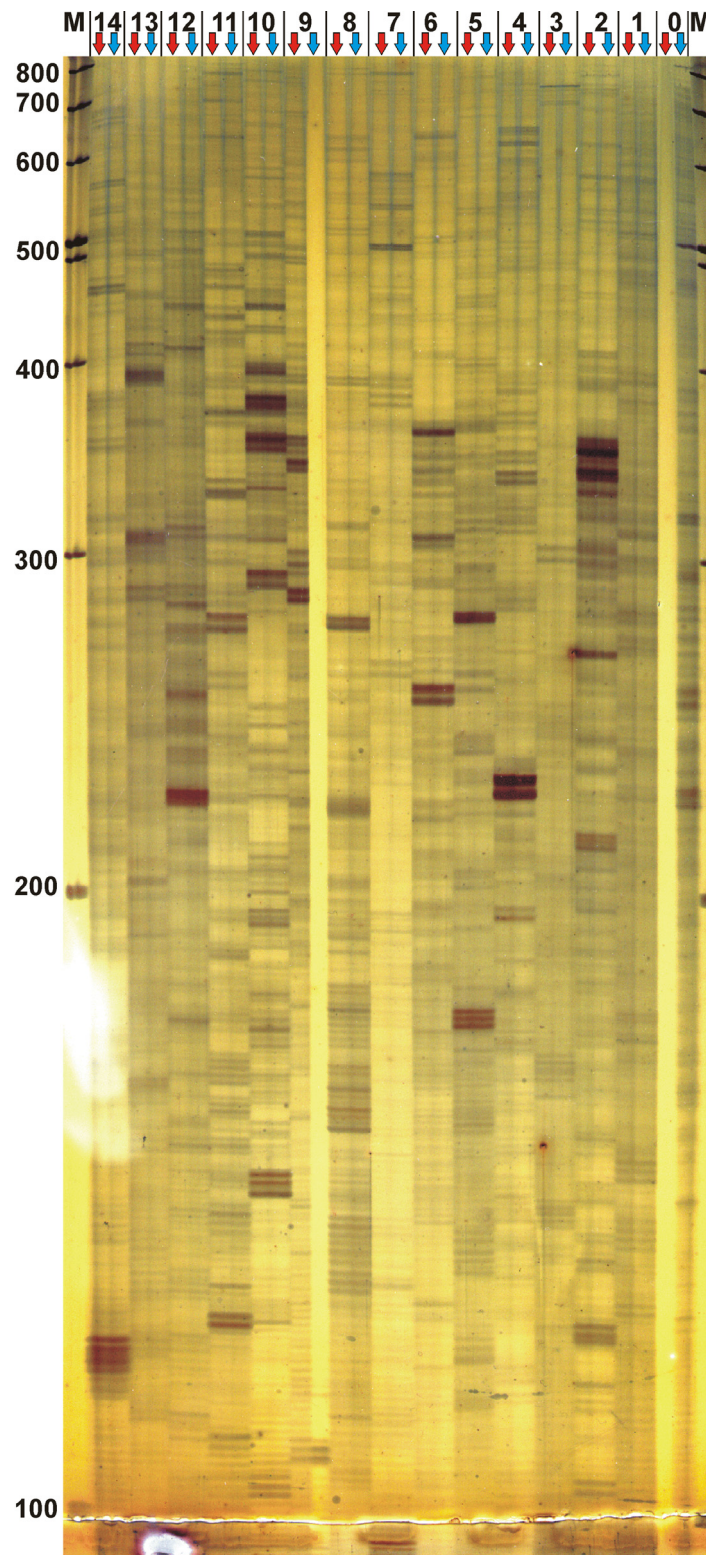


Abb. 3.8: Beispiel einer EDD-PCR

Im Polyacrylamidgel wurden die Bandenmuster aus Reaktionen mit dem Poly-T-Primer "K" und von rechts nach links den 5'-Primern "0" - "14" aufgetrennt. Die linke Spur jeder Primerkombination geht auf 46A (rote Pfeile), die rechte auf DGV (blaue Pfeile) zurück. M: Längenstandard 100 bp-Leiter "plus"

3.1.2.c Versuche zur Klonierung von Mutanten- bzw. Wildtyp-spezifischen cDNAs mittels der SSH

In beiden vorangegangenen Differential Display-Analysen konnten keine signifikanten Unterschiede in den Bandenmustern zwischen DGV und 46A festgestellt werden. Um doch noch Unterschiede auf Ebene der Transkription in den untersuchten Geweben detektieren zu können, wurde eine “Suppression Subtractive Hybridization” (SSH) durchgeführt. Laut den Originalautoren (GURSKAYA et al., 1996; DIATCHENKO et al., 1996) zeichnet sich die SSH durch eine besondere Sensitivität bei der Detektion von Expressionsunterschieden auch seltener Transkripte aus.

Es wurde versucht in der SSH eine Anreicherung von differentiell exprimierten cDNAs sowohl für den Wildtyp DGV als auch für die Mutante 46A durchzuführen. In einer sog. “Vorwärts-Subtraktion” wurden die Wildtyp-cDNAs von den Mutanten-cDNAs subtrahiert; in einer sog. “Reversen-Subtraktion” wurden umgekehrt die Mutanten-cDNAs von den Wildtyp-cDNAs abgezogen. Die erstellten cDNA-Libraries wurden anschliessend durch Sequenzierungen, Datenbank-Homologie-Vergleiche, und durch virtuelle und reverse virtuelle Northern Blots weitergehend analysiert, um eine Anreicherung für differentiell exprimierte cDNAs zu überprüfen. Eine schematische Darstellung der Methode ist in Abb. 3.11 gegeben worden (siehe auch 2.14).

Aus den eingesetzten Spross-Apices von DGV und 46A konnte nicht genügend RNA für eine anschliessende Anreicherung auf Poly-A-RNA gewonnen werden. Deswegen wurde als Ausgangsmaterial Gesamt-RNA eingesetzt, die mit der SMART-Technologie in cDNA transkribiert wurde. Bei der anschliessenden LD-PCR wurde die optimale Zyklenanzahl auf 17 PCR-Zyklen festgelegt. Die Qualität der amplifizierten cDNA wurde in einem Agarosegel überprüft (Abb. 3.9). Sie zeigte eine gute Übereinstimmung mit Vergleichsbildern des “CLONTECH PCR-Select cDNA Subtraction Kit”. Auch der anschliessende Verdau der cDNA mit *Rsa* I wurde im Agarosegel überprüft (Abb. 3.9). Nach der Adapter-Ligation und den zwei Hybridisierungen, deren Effektivität nicht direkt kontrolliert werden kann, erfolgte die PCR I und die anschliessende “Nested”-PCR. Diese beiden Reaktionen wurden im Agarosegel überprüft (Abb. 3.10). Sie zeigten eine gute Übereinstimmung mit Vergleichsbildern des “CLONTECH PCR-Select cDNA Subtraction Kit”.

Die Produkte der "Nested-PCR" wurden für die Erstellung der SSH-cDNA-Libraries kloniert und in *E. coli* transformiert. Es erwies sich als vorteilhaft kommerziell angebotene Zellen mit besonders hoher Kompetenz für die Transformation einzusetzen (siehe 2.14.10).

Die Größe der klonierten SSH-cDNA-Fragmente lag zwischen 200 bp und 1200 bp. Die durchschnittliche Fragmentgröße betrug ca. 550 bp.

1. Vorwärts-Subtraktion

Es wurde eine SSH-cDNA-Library mit 240 Klonen angezogen und bei - 80 °C gelagert.

1. Reverse-Subtraktion

Es wurde eine SSH-cDNA-Library mit 194 Klonen angezogen und bei - 80 °C gelagert.

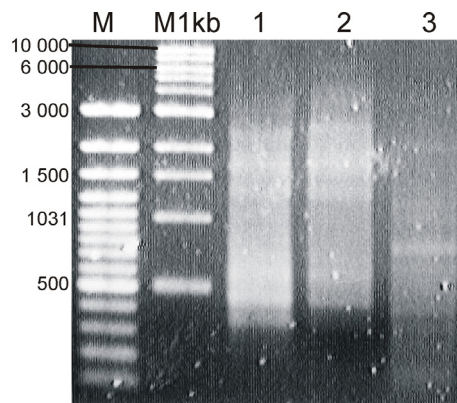


Abb. 3.9: Kontrollgel der SSH
Spur 1: LD-PCR aus SMART-cDNA; Spur 2: Aufreinigung der LD-PCR; Spur 3: Aufreinigung des *Rsa* I-Verdaus; Längenstandards: M: 100 bp Leiter plus, M 1kb: 1 kb-Leiter

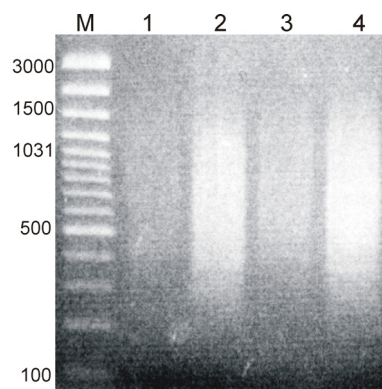
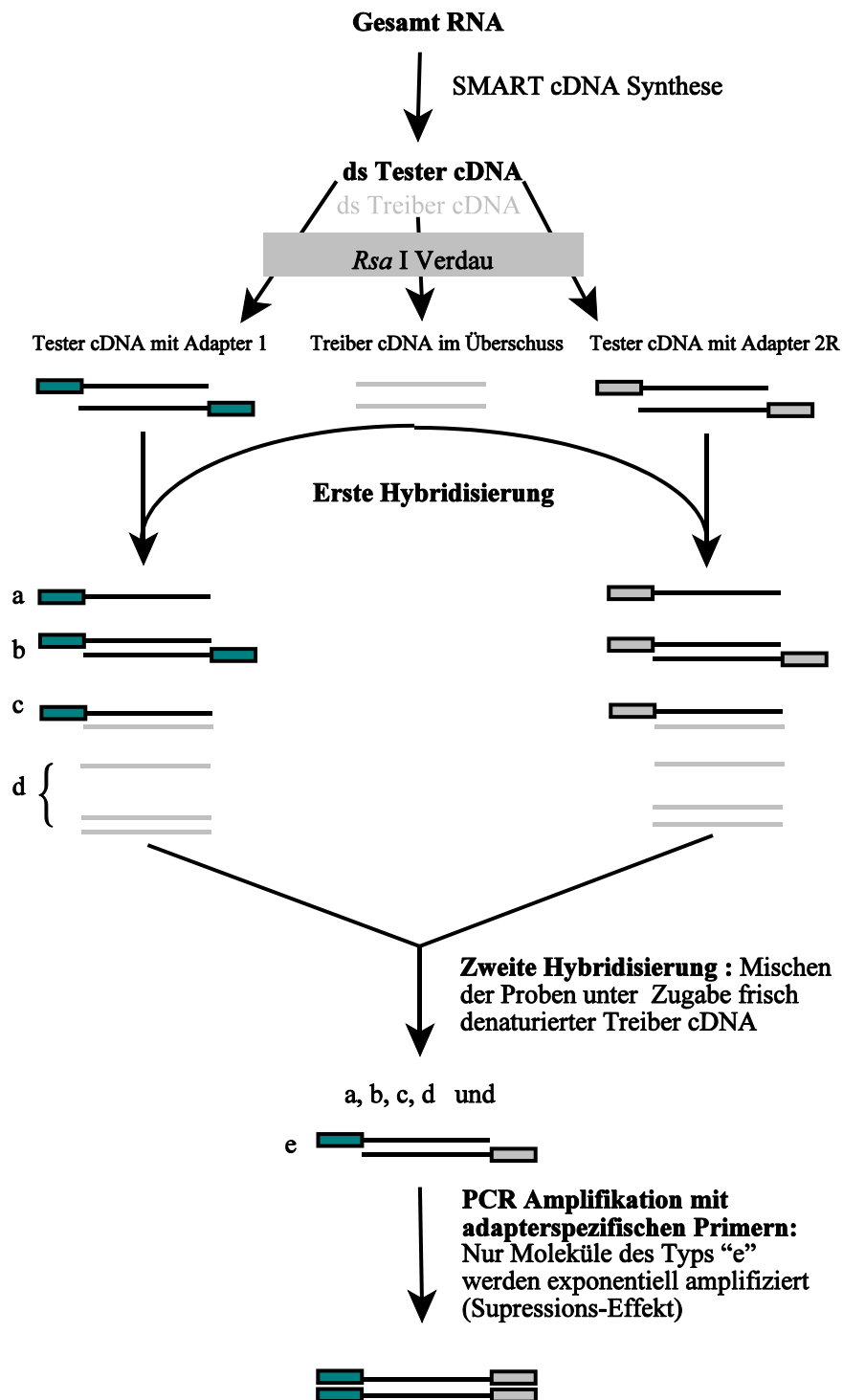


Abb. 3.10: Kontrollgel der PCR I und der Nested-PCR
Spur 1/2 Vorwärts-Subtraktion, Spur 3/4 Reverse Subtraktion, Spur 1 & 3 PCR I, Spur 2 & 4 Nested PCR; M: 100 bp Leiter plus



Die PCR-Probe ist angereichert mit differentiell exprimierten cDNAs. Zum Erhalt einer **SSH-Library** wird sie kloniert.

Abb. 3.11: Schema der Suppression Subtractive Hybridisation (SSH)

3.1.2.d Differentielles Dot-Blot-Screening

Alle Klone der 1. Vorwärts-Subtraktion und der 1. Reversen-Subtraktion wurden in einem differentiellen Dot-Blot-Screening analysiert, um ihre differentielle Expression zu verifizieren. Jeweils vier parallel erstellte Dot-Blot-Membranen mit je 96 Klonen (2.15.2) wurden parallel mit vier verschiedenen Sonden hybridisiert:

- a) SMART-cDNA-Sonde der Mutante 46A,
- b) SMART-cDNA-Sonde des Wildtyps DGV,
- c) SSH-cDNA-Sonde der Vorwärts-Subtraktion auf 46A-spezifische Klone,
- d) SSH-cDNA-Sonde der Reversen-Subtraktion auf DGV-spezifische Klone.

Bei den Sonden a) und b) handelt es sich um nicht angereicherte Ausgangs-cDNA. Bei den Sonden c) und d) um durch die jeweilige SSH differentiell angereicherte cDNAs (2.15.4).

Das differentielle Dot-Blot-Screening ergab signifikante und reproduzierbare Hybridisierungssignale. Es konnte sehr stringent gewaschen und damit eine Reduktion von unspezifischen DNA-DNA-Bindungen und Membran-Hintergrund erreicht werden. Die Belichtungszeiten bei wiederholter Filmauflage variierten von minimal 5 sec bis zu 20 min, um alle Signale optimal ohne Über- oder Unterbelichtungen darstellen zu können.

Bei den Hybridisierungen mit den SMART-cDNA-Sonden von Mutante und Wildtyp ergaben sich sowohl für die Klone der Vorwärts- als auch für die Klone der Reversen-Subtraktion keine signifikanten Unterschiede in den Signalen.

Bei den Hybridisierungen mit den SSH-cDNA-Sonden hybridisierten 40 der 240 Klone der Vorwärts-Subtraktion reproduzierbar stärker mit der SSH-cDNA-Sonde der Vorwärts-Subtraktion (Abb. 3.12). Diese Klone wurden weitergehend analysiert.

Bei den Hybridisierungen mit den SSH-cDNA-Sonden hybridisierten 7 der 194 Klone der Reverse-Subtraktion reproduzierbar stärker mit der SSH-cDNA-Sonde der Reverse-Subtraktion.

Diese Klone wurden weitergehend analysiert.

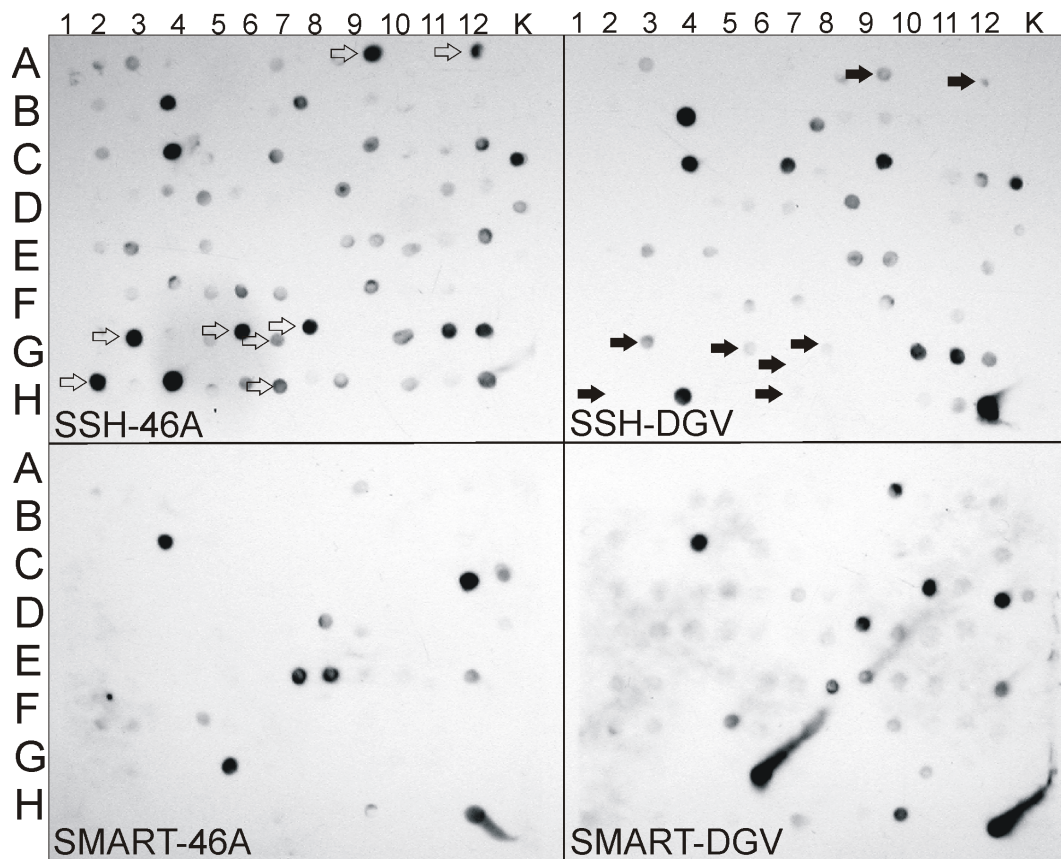


Abb. 3.12: Beispiel für differentielles Dot-Blot-Screening

Parallele Hybridisierung der Klone 97 - 192 aus der Vorwärts-SSH (angereichert für 46A-spezifisch exprimierte Klone) mit den vier markierten cDNA-Libraries SSH-46A, SSH-DGV, SMART-cDNA-46A und SMART-cDNA-DGV. Klone, die mit der SSH-46A signifikant stärker hybridisieren, sind mit Umriss-Pfeil markiert. Zum direkten Vergleich sind diese Klone in der Hybridisierung mit SSH-DGV mit schwarzen Pfeilen markiert. Im Vergleich der SMART-cDNA-Sonden aus DGV und 46A ergaben sich keine reproduzierbaren Unterschiede.

3.1.2.e Sequenzanalyse

Die 47 Klone, darunter 40 der 1. Vorwärts-Subtraktion und 7 der 1. Reversen Subtraktion, welche im differentiellen Dot-Blot-Screening ein reproduzierbar unterschiedliches Signal zwischen den SSH-cDNA-Sonden gezeigt hatten, wurden sequenziert. Die Sequenzen wurden mit der NCBI-Datenbank zum einen auf homologe ESTs (BLASTN-est) und zum zweiten auf homologe Proteine zu den in die 6 möglichen ORFs translatierten ESTs gesucht (BLASTX-

translated query nucleotide - protein database) verglichen.

29 der ESTs ergaben keine Treffer zu ESTs der Datenbank. 14 der ESTs ergaben Treffer zu ESTs aus Spross-, Blatt oder Blüten-Gewebe, 4 zu Wurzelgewebe und ein EST zeigte Homologien zu dem Mykorrhiza-Pilz *Gigaspora rosea* (Eine genaue Auflistung siehe Anhang).

Beim Vergleich mit Proteinen zeigten 31 der EST keine signifikanten Homologien zu Proteinen der Datenbank. 11 der ESTs zeigten Homologien zu Proteinen bekannter und 4 zu Proteinen unbekannter Funktion. In der Tabelle 3.3 sind die ESTs mit signifikanten Homologien zu Proteinen der NCBI-Datenbank aufgelistet.

Eines der detektierten Proteine mit bekannter Funktion, und zwar die Phytoene Synthase, ein Protein der Karotinoid-Biosynthese, wird vor allem während der Blütenentwicklung exprimiert (GIULIANO et al., 1993, ZHU et al., 2002).

Tab. 3.3: Homologien der Sequenzen der 1. SSH zu Proteinsequenzen der NCBI-Datenbank. Sequenz-Namen von Klonen der Vorwärts-Subtraktion beginnen mit 46A. Sequenz-Namen von Klonen der Reversen-Subtraktion beginnen mit DGV. * E ist der Wert des negativen decadischen Logarithmus (Beispiel: $5 \Rightarrow 10^{-5}$) für die Wahrscheinlichkeit, das eine gefundene Übereinstimmung zwischen den Sequenzen zufällig ist. Je höher der E-Wert, desto unwahrscheinlicher eine zufällige Homologie.

Sequenz-Name	Homologie zu Protein	E*
46A-M1a8-T7	mögl. Thioredoxin-Domäne, Disulfid-Isomerase <i>Arabidopsis</i>	92
46A-M1b1-T7	Phospho-Enol-Pyruvat- Decarboxylase-ähnliches Protein <i>Arab.</i>	63
46A-M1b12-T7	Ku70-ähnliches Protein (DNA-Helicase II) <i>Arabidopsis</i>	64
46A-M1b3-T7	hypothetisches Protein <i>Arabidopsis</i>	8
46A-M1c10-T7	bacterielles ribosomales Protein	20
46A-M1c11-T7	Peptidase <i>Oryza sativa</i>	6
46A-M1c12-T7	Auxin-bindender Transkriptionsfaktor ARF6 <i>Arabidopsis</i>	60
46A-M1c3-T7	hypothetisches Protein <i>Arabidopsis</i>	30
46A-M1c4-T7	hypothetisches Protein <i>Arabidopsis</i>	11
46A-M1d10-SP6/T7	Carnitine Acetyl Transferase <i>Arabidopsis</i>	60
46A-M1d3-T7	Phytoene Synthase <i>Lycopersicum esc.</i>	73
46A-216-SP6	Auxin-bindender Transkriptionsfaktor ARF6 <i>Arabidopsis</i>	31

Sequenz-Name	Homologie zu Protein	E*
DGV-M1a2-SP6/T7	Phospho-Enol-Pyruvat- Decarboxylase-ähnliches Protein <i>Arab.</i>	60
DGV-M1a3-SP/T7	Phospho-Enol-Pyruvat- Decarboxylase-ähnliches Protein <i>Arab.</i>	68
DGV-M1a5-T7	unbekanntes Protein <i>Drosophila</i>	6

3.1.2.f Virtueller Northern Blot

Insgesamt 6 der Klone, die ein differentielles Signal in der Dot-Blot-Analyse gezeigt hatten, wurden in einem virtuellen Northern Blot weiter untersucht. Hierfür wurde SMART-cDNA elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 3.13), denaturiert und auf Nylonmembran geblottet. Die ausgewählten cDNA-Klone wurden PCR mit DIG-Oxygenin markiert und anschließend mit der SMART-cDNA hybridisiert. Diese Analyse ist in etwa vergleichbar mit einem klassischen Northern mit einem hohen mRNA-Anteil.

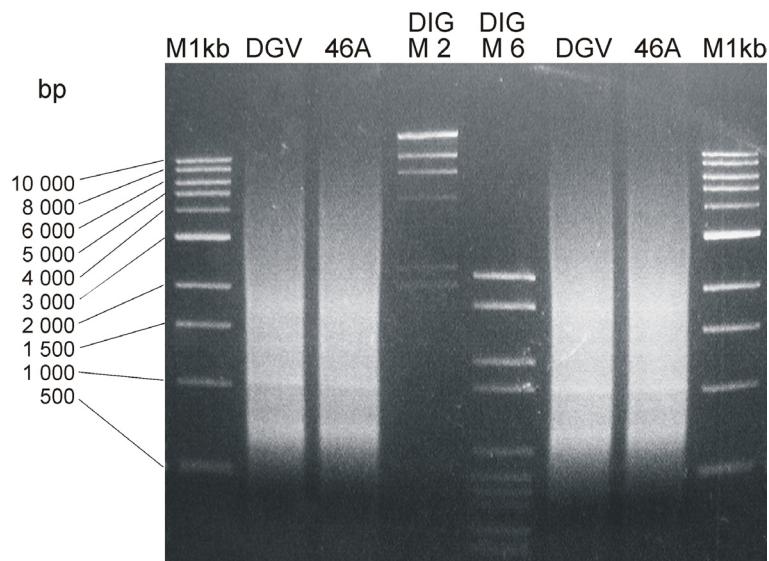


Abb. 3.13: SMART-cDNA für Virtual Northern Blot
 Je 37 µl einer SMART-cDNA-PCR von DGV und 46A wurden zweimal in einem 1,2%igen Gel aufgetrennt. Die cDNA-Fragmente erstrecken sich über einen Größenbereich von 500 - über 10000 bp. M1kb: 1 kb-Leiter, DIG M2, DIG M6: DIG-markierte Längenstandards M2 und M6

Die virtuelle Northern-Blot-Analyse ergab signifikante und reproduzierbare Hybridisierungssignale. Die Belichtungszeit lag je nach Klon zwischen 2 und 20 min.

Die virtuelle Northern-Blot-Analyse ergab keine Unterschiede in den Signalstärken zwischen der SMART-cDNA von DGV und 46A (Abb. 3.14).

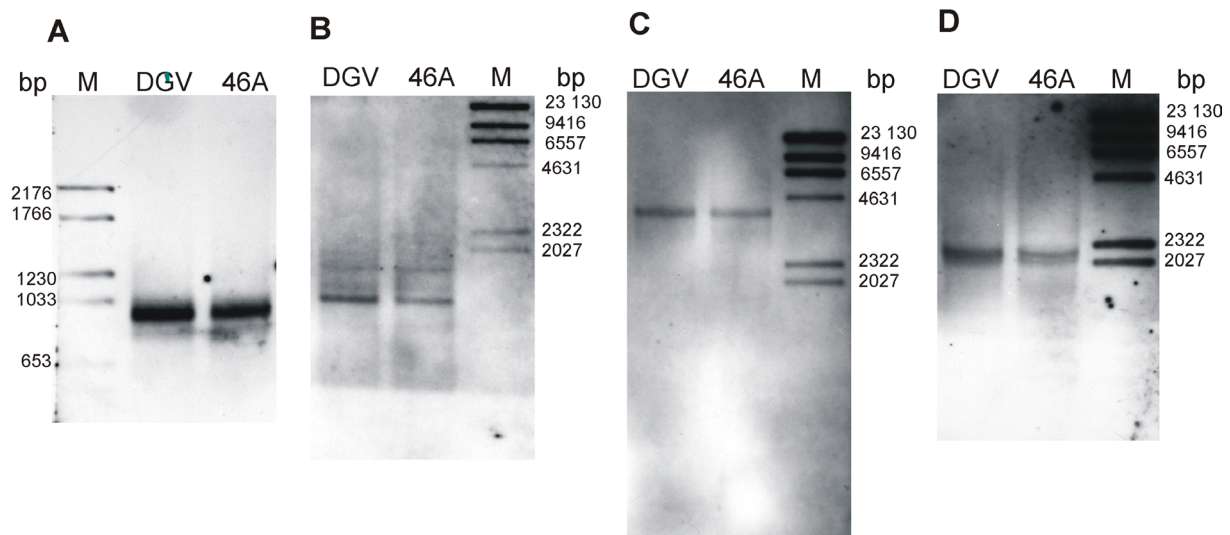


Abb. 3.14: Beispiele für Virtual-Northern-Blot-Analyse

A - C: Klone der für 46A-spezifische Klone angereicherten Vorwärts-Subtraktion, **A:** Klon Nr. 135, Größe der cDNA ca. 900 bp, **B:** Klon Nr. 4, Größe der cDNA ca. 1400 bp, **C:** Klon Nr. 104, Größe der cDNA ca. ca. 4000 bp; **D:** Klon Nr. 130 der Reversen-Subtraktion, angereichert für DGV-spezifische Klone, Größe der cDNA ca. 2100 bp; M: DIG-Längenstandards M6 (**A**) & M2 (**B - D**)

3.1.2.g Wiederholung der SSH

Um die Möglichkeit eines Fehlers bei der Durchführung der 1. SSH zu überprüfen, wurde eine komplett unabhängige Wiederholung der Vorwärts-Subtraktion durchgeführt.

Bei dieser Wiederholung wurden von der Mutante 46A an zwei Zeitpunkten Apices präpariert, und zwar nach 11 Tagen und nach 16 Tagen. Während nach 11 Tagen unter dem Binokular noch keine Blühmeristeme sichtbar waren, war die Entwicklung der Blühmeristeme nach 16 Tagen sehr weit fortgeschritten. Von beiden Präparationen wurde unabhängig SMART-cDNA hergestellt. Diese wurde unabhängig in der LD-PCR amplifiziert. Nach der Aufreinigung der PCR wurden beide Eluate zu gleichen Teilen vereinigt und der SSH-Prozedur unterzogen.

Es wurde eine cDNA-Library mit 1000 Klonen angezogen und bei - 80 °C gelagert.

96 zufällig ausgewählte Klone der cDNA-Library wurden weitergehend analysiert.

3.1.2.h Reverser virtueller Northern-Blot

Die 96 ausgewählten Klone der SSH-Library wurden in einem reversen virtuellen Northern-Blot analysiert, um ihre mögliche differentielle Expression zu überprüfen. Im Gegensatz zum einfachen Auftropfen von PCR-Produkt beim differentiellen Dot-Blot-Screening werden hier die PCR-amplifizierten cDNA-Klone zuerst im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Dies ermöglicht eine Grössenabschätzung der DNA-Fragmente. Vor allem aber führt es zu der Separierung des interessierenden Klonen von PCR-Nebenprodukten und Verunreinigungen. Dadurch wurde erhofft, spezifischere Signale in der Hybridisierung gewinnen zu können. Es wurde im Gegensatz zum Dot-Blot-Screening nur mit SMART-cDNA-Sonden der Mutante und des Wildtyps eine Hybridisierung durchgeführt. Die Hybridisierungen ergaben distinkte und reproduzierbare Ergebnisse. Es konnten jedoch auch hier keine Unterschiede der Signalstärken zwischen der Wildtyp- und der Mutanten-Sonde festgestellt werden (Abb. 3.15).

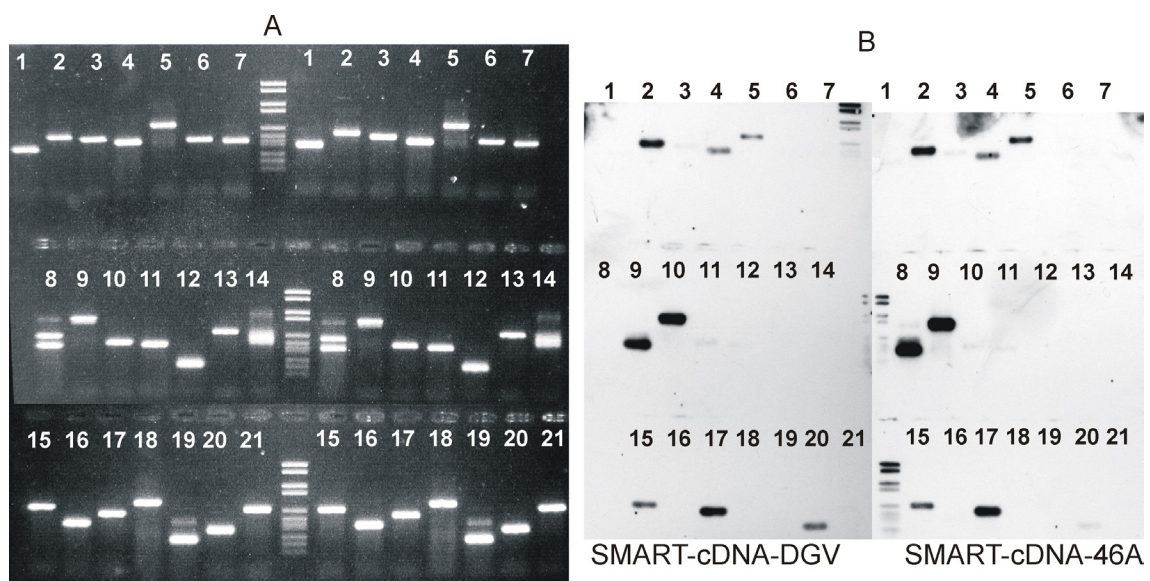


Abb. 3.15: Beispiel für einen reversen “virtual Northern Blot”

Klone 1 - 21 der 2. Vorwärts-SSH wurden amplifiziert, elektrophoretisch je zweimal aufgetrennt (A), geblottet und parallel mit Sonden aus SMART-cDNA der DGV und der 46A hybridisiert (B). Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Intensität der Hybridisierung festgestellt werden. Marker war der DIG-Längenstandard VI mit 2176, 1766, 1230, 1033, 653, 517, 453, 394, 298, 234, 220, 154 bp

3.1.2.i Sequenzanalyse

Es sollten weiterführende Sequenz-Daten von Klonen der SSH-Library gewonnen und analysiert werden. Die Auswahl der Klone erfolgte zufällig, da die vorhergehenden virtuellen reversen Northern-Blot-Analysen nicht zur Selektion spezieller Kandidaten-Klone geführt hatte. Insgesamt wurden 59 Klone sequenziert. Die Sequenzen wurden mit der NCBI-Datenbank zum einen auf homologe ESTs (BLAST/Nucleotide BLAST/Standard nucleotide-nucleotide BLAST/est) und zum zweiten auf homologe Proteine zu den mittels der 6 möglichen ORFs in Proteinsequenzen translatierten ESTs durchsucht (BLAST/Translated BLAST Searches/ Nucleotide query-Protein db).

Im BLASTN-est zeigten 49 ESTs signifikante Homologien zu Sequenzen der Datenbank, darunter waren als Top-Treffer 39 *Medicago truncatula*-, 7 *Glycine maximum*-, 2 *Lotus japonicus*- und 1 *Pisum sativum*-EST. Für 10 ESTs konnten keine Treffer gefunden werden. 37 mal stammten die Top-Treffer aus Spross-, Blatt-, Blüten-, oder Frucht-Gewebe. 16 dieser ESTs stammten aus reproduktivem Gewebe (Eine genaue Auflistung findet sich im Anhang). Im BLASTX wurden für 51 ESTs homologe Proteinsequenzen gefunden (siehe Tabelle 3.4), darunter als Top-Treffer 32 *Arabidopsis*-, 11 *Pisum sativum*-, 3 *Nicotiana tabacum*-, 2 *Oryza sativa*-, 2 *Lycopersicum esculentum*-, 1 *Cicer arietinum* und 1 *Coffea arabicum*-Sequenzen. 32 Proteine mit bekannter Funktion, 7 Proteine mit putativer Funktion und 12 hypothetische, putative Proteine oder Proteine unbekannter Funktion wurden durch die BLAST-Suche gefunden.

Tab. 3.4: Homologien der Sequenzen der 2. SSH zu Protein-Sequenzen der NCBI-Datenbank. * E ist der negative decadische Logarithmus (Beispiel: $5 \Rightarrow 10^{-5}$) für die Wahrscheinlichkeit, dass eine gefundene Übereinstimmung zwischen den Sequenzen zufällig ist. Je höher der E-Wert, desto unwahrscheinlicher eine zufällige Homologie.

Sequenz-Name	BLAST-X Homologie zu Protein	E*
3a01sp6	unbekanntes Protein <i>Arabidopsis</i>	65
3a06sp6	putatives Zinkfinger Protein <i>Hordeum vulgare</i>	35
3b03sp6	putatives Protein <i>Arabidopsis</i>	27
3b04sp6	unbekanntes Protein <i>Arabidopsis</i>	15
3c01sp6	putative Arginin Methyltransferase <i>Arabidopsis</i>	58
3c06sp6	putatives Protein <i>Arabidopsis</i>	19

Sequenz-Name	BLAST-X Homologie zu Protein	E*
3d01sp6	Stärke-Verzweigungs-Enzym <i>Pisum sativum</i>	48
3d02t7	Histon H2A <i>Pisum sativum</i>	25
3d03sp6	Chlorophyll ribosomales Protein S18 <i>Pisum sativum</i>	39
3d05sp6	E2 Ubiquitin-anbindendes Enzym <i>Arabidopsis</i>	52
3e02sp6	Ribosomen-assoziiertes Protein p40 <i>Cicer arietinum</i>	34
3e03sp6/t7	Turgor-respondierendes Protein <i>Pisum sativum</i>	58
3e04sp6	putatives Protein <i>Arabidopsis</i>	6
3e06t7	putative UDP-Glycosyl-Transferase <i>Arabidopsis</i>	76
3f01sp6	60S ribosomales Protein L36-2 <i>Arabidopsis</i>	42
3f02sp6	Zyclin D 3-1 <i>Nicotiana tabacum</i>	68
3f03sp6	GTP-bindendes Protein Rab1 <i>Pisum sativum</i>	92
3f05sp6/t7	GTP-bindendes Protein Ran1 <i>Pisum sativum</i>	79
3f06sp6/t7	Ribosomales Protein L7A <i>Pisum sativum</i>	56
3g01sp6	Transaldolase <i>Lycopersicum esculentum</i>	58
3g02sp6/t7	PINHEAD/Zwille Protein <i>Arabidopsis</i>	8
3g03sp6/t7	XAP-5 (Funktion unbekannt) <i>Arabidopsis</i>	58
3g04sp6/t7	Ribosomales Protein L10 <i>Arabidopsis</i>	71
3g05sp6/t7	hypothetisches Protein <i>Arabidopsis</i>	30
3g06sp6	NLS Importin-alpha <i>Oryza sativa</i>	10
3h01sp6/t7	RNA-Polymerase II <i>Coffea arabicum</i>	39
3h02sp6/t7	DNA-bindendes Protein MYB1 <i>Lycopersicum esculentum</i>	7
3h04sp6	unbekanntes Protein <i>Arabidopsis</i>	43
3h06sp6/t7	Protein ähnlich Rezeptor-ähnliche-Kinase <i>Arabidopsis</i>	32
IA03sp6/t7	Myb-verwandtes Protein <i>Arabidopsis</i>	24
IA04T7	TATA-box-binding-protein associated Factor <i>Arabidopsis</i>	44
IA05SP6/t7	proteasome subunit PAF1 <i>Arabidopsis</i>	5
IB01SP6/t7	putatives Protein <i>Arabidopsis</i>	11
IE01SP6/t7	Phosphoprotein Phosphatase <i>Arabidopsis</i>	32
IE02SP6/t7	putatives G-Protein Alpha Untereinheit <i>Arabidopsis</i>	42
IE03T7	hypothetisches Protein <i>Arabidopsis</i>	10
IE04T7	hypothetisches Protein <i>Arabidopsis</i>	47

Sequenz-Name	BLAST-X Homologie zu Protein	E*
IF01SP6/t7	Peroxisomen-Ziel-Sequenz 1 Rezeptor <i>Nicotiana tabacum</i>	64
IF02SP6/t7	putatives Clathrin assemblierendes Protein <i>Arabidopsis</i>	41
IF03SP6/t7	Chlorophyll a/b-bindendes Protein Typ II precursor <i>Pisum</i>	31
IH01SP6/t7	RSZp22 Splicing-Faktor <i>Arabidopsis</i>	10
IH03SP6/t7	Zyclin D 3.2 <i>Nicotiana tabacum</i>	12
IH05SP6/t7	Replications-Faktor C 36kDa Untereinheit <i>Oryza sativa</i>	53
E1	RUBISCO I Untereinheit <i>Pisum sativum</i>	40
E2	Myb-ähnliches Protein CDC5 <i>Arabidopsis</i>	40
E3	putatives Protein <i>Arabidopsis</i>	4
E4	unbekanntes Protein <i>Arabidopsis</i>	1
E5	Zentrin, EF-hand Protein <i>Arabidopsis</i>	33
E6	Preprotein Translocase SECY <i>Arabidopsis</i>	51
E7	Ribonuclease S5 <i>Pisum sativum</i>	74
E8	Chlorophyll-B Bindungs Protein <i>Pisum sativum</i>	118

Eine Auswahl an durch die Sequenzanalyse detektierten Proteinen und ihrer Funktion sei im folgenden kurz dargestellt:

1. Zyclin Typ D3

Es wird angenommen, dass D-Typ-Zykline eine wichtige Rolle bei Signaltransduktionen zur Regulation von Zellteilung und DNA-Replikation spielen (KVARNHEDEN et al., 2000; MEIJER und MURRAY, 2000). Aufgrund ihrer Funktion werden die D-Typ-Zykline vor allem in meristematischen Zellen exprimiert und spielen auch in der Regulation des Blüh-Meristems eine wichtige Rolle (GAUDIN et al., 2000).

2. GTP-bindende Proteine ähnlich Rab1 und Ran1

GTP-bindende Proteine spielen eine Rolle in der Regulation des Proteintransports. So scheinen Ran-Proteine eine Funktion beim Kernimport anderer Proteine zu besitzen und den Zellzyklus zu beeinflussen (ROSE und MEIER, 2001). Sie werden verstärkt in meristematischem Gewebe exprimiert (HAIZEL et al., 1997). Rab-Proteine regulieren wahrscheinlich den Protein-Transport vom ER zum Golgi-Apparat (SAINT-JORE et al., 2002). Ein Mitglied der Rab-

Protein-Familie wird in *Petunia hybrida* verstärkt in Blüten exprimiert (JAKO und TEYSSENDIER DE LA SERVE, 1996).

3. PINHEAD/ZWILLE-Protein

Das PINHEAD/ZWILLE-Gen spielt eine wichtige Rolle in der Regulation und Formierung des Spross-Apikal-Meristems und der adaxialen Zell-Spezifikation (NISHIMURA et al., 2002). Pinhead-Mutanten zeigen unter anderem auch Defekte der Blütenorgane (LYNN et al., 1999).

4. NLS Importin-Alpha-Protein

Importin-Proteine vermitteln als Heterodimer (Alpha- und Beta-Untereinheit) den Transport von Kern-Lokalisations-Sequenz (NLS)-konjugierten Proteinen in den Zellkern (HUBNER et al., 1999).

5. Myb-verwandte-Proteine

Mehrfach wurden Homolgien zu verschiedenen Myb-Proteinen detektiert. Myb-Proteine sind eine diverse Klasse von Proteinen, die als gemeinsames Merkmal eine bis zu drei charakteristische DNA-bindende-Domänen besitzen. In *Arabidopsis* sind über 100 verschiedene Myb-Proteine bekannt. Sie haben regulatorische Funktionen im Sekundär-Metabolismus, der Zell-Morphogenese, der Meristem-Regulation und im Zell-Zyklus (JIN und MARTIN, 1999). Die Mehrzahl der Myb-Proteine sind Transkriptionsfaktoren (UIMARI und STROMMER, 1997). Es sind aber auch Splicing-Faktoren bekannt, wie das hier detektierte CDC5-Protein (BURNS et al., 1999). Eine größere Anzahl an Myb-Proteinen ist in die Blüte involviert (SABLOWSKI et al., 1994; UIMARI und STROMMER, 1997; QUATTROCCHIO et al., 1999).

6. Rezeptor-ähnliche Kinase RLK

RLK-Proteine besitzen eine Signalsequenz, eine Transmembranregion und eine zyttoplasmatische Kinase-Domäne. RLKs gehören zu einer großen Genfamilie mit über 600 Mitgliedern in *Arabidopsis* (SHIU und BLEECKER, 2001). Eine Anzahl an blütenspezifisch exprimierten RLKs sind in *Arabidopsis* identifiziert worden, so zum Beispiel CLAVATA (CLARK et al., 1997) und RKF1 - 3 (TAKAHASHI et al., 1998).

3.2 Ergebnisse zur Analyse des *Development Funiculus-Locus*

3.2.1 Kreuzung und Aufspaltung der Pflanzen

Die Kreuzung des Wildtyps DGV mit der Linie PF, die Träger der *def* Mutation ist, führte in ca. 50 % der Kreuzungen zu einer erfolgreichen Fruchtanlage mit einer stark reduzierten Anzahl an Samen pro handbestäubte Blüte. Die F1 zeigte uniform den dominanten *def*-Phänotyp des Wildtyps. In der F2-Generation segregierte der *def*-Phänotyp 355 Wildtyppflanzen zu 121 Mutanten. Dies folgt einer 3 : 1 Aufspaltung ohne signifikante Abweichung von dem Mendelschen Erbgang bei 5 %igem Fehler erster Art (siehe Tabelle 3.5). Der Mutanten-Phänotyp war eindeutig zu identifizieren und vom Wildtyp zu unterscheiden. Er beschränkte sich auf die veränderte Morphologie des Funiculus und beeinflusste keine weiteren sichtbaren Merkmale.

Tab. 3.5: Aufspaltung des *def*-Phänotyps in der F2-Population

	Wildtyp (<i>DEF/x</i>)	Mutante (<i>def/def</i>)	Gesamt
beobachtet	355	121	476
erwartet	357 (3/4 vom Gesamt)	119 (1/4 vom Gesamt)	476
χ^2	0,0112	0,0336	0,0448
<i>df</i> 1; <i>P</i> = 0,83234			

Der Genotyp der den dominanten Phänotyp zeigenden F2-Pflanzen wurde über eine Analyse der F3-Generation aufgeklärt. Bei homozygotem Elter war die F3 uniform, während bei heterozygotem Elter eine 3 : 1 Aufspaltung zu erwarten war. Diese Analyse von 355 F2-Pflanzen mit Wildtyp-Phänotyp ergab 115 homozygot dominante und 240 heterozygote Genotypen. Die genotypische Aufspaltung 115 : 240 : 121 folgte einer, bei einem kodominanten Mendelschen Erbgang zu erwartenden, 1 : 2 : 1 Aufspaltung ohne signifikante Abweichung (α = 5 %; siehe Tab. 3.6).

Tab. 3.6: Aufspaltung des Genotyps der F2-Population nach F3-Analyse

	<i>DEF/DEF</i>	<i>DEF/def</i>	<i>def/def</i>	Gesamt
beobachtet	115	240	121	476
erwartet	119 (1/4)	238 (2/4)	119 (1/4)	476
χ^2	0,134	0,017	0,034	0,185
<i>df</i> 2, <i>P</i> = 0,9117				

3.2.2 Amplified Fragment Length Polymorphism-Analyse (AFLP)

Es wurde eine Amplified Fragment Length Polymorphism-Analyse (AFLP) durchgeführt (VOS et al., 1995). Mit dieser kombinierten Methode aus Restriktionsverdau und spezifischer PCR können eine große Anzahl von DNA-Loci amplifiziert werden, ohne vorhergehende genomische DNA-Sequenzinformationen von der untersuchten Species zu besitzen. Die Gruppe amplifizierter Fragmente wird über die Auswahl von selektiven Basenpaaren am 3'-Ende der eingesetzten Primer bestimmt. Im Vergleich verschiedener DNA-Proben von z. B. verschiedenen Pflanzensorten auftretende Amplifikationsunterschiede können auf DNA-Polymorphismen, wie Deletionen, Insertionen etc. zurückgeführt werden. Auch Punktmutationen in Restriktionserkennungssequenzen und den angrenzenden selektiven Basenpaaren sind Ursache solcher Polymorphismen. Ein Schema der Methode ist in Abb. 3.16 dargestellt.

Die AFLP-Prozedur wurde an zwei Abschnitten auf die Vergleichbarkeit der Resultate überprüft: Zum Einen wurde ein Aliquot jeder Probe nach Restriktions- und Ligations-Reaktion und zum Zweiten ein Aliquot der Preamplifikations-PCR im Agarosegel analysiert (Abb. 3.17). Hierbei wurde die Konsistenz der Ergebnisse überprüft. Nur bei vergleichbaren Resultaten war von einem vollständigen Verdau auszugehen. Fehlerhafte AFLP-Profile konnten durch diese Kontrollen in allen Fällen auf unvollständigen Restriktionsverdau, zu hohe DNA-Konzentration oder fehlerhafte Preamplifikation zurückgeführt werden.

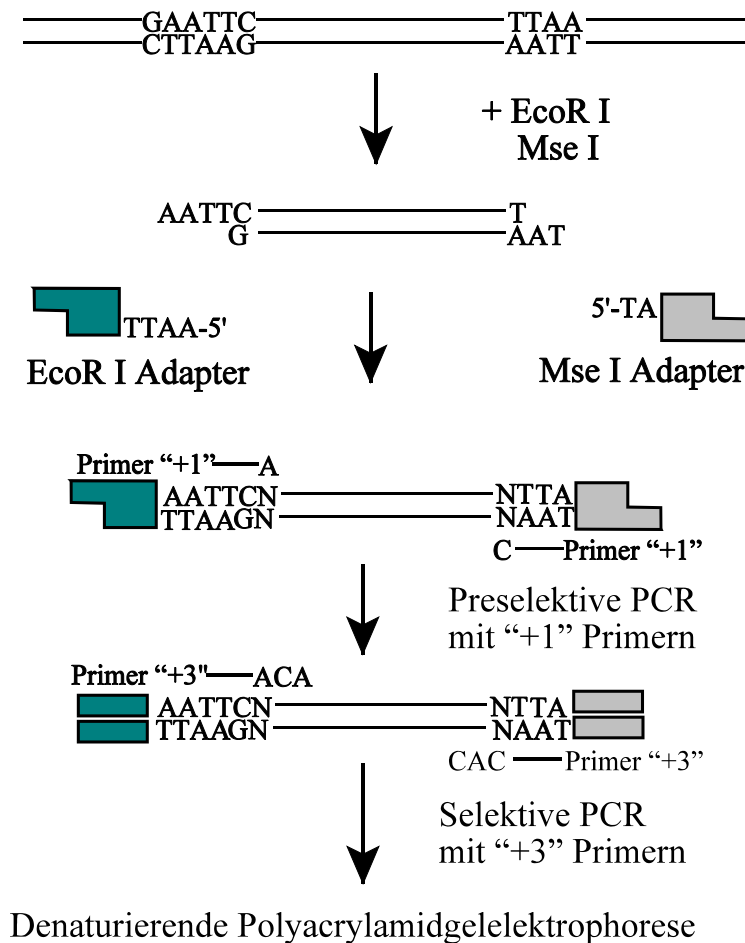


Abb. 3.16: Schema der Amplified Fragment Length Polymorphism-Analyse (AFLP)
 In einem ersten Schritt erfolgt die Restriktion der DNA mit den Restriktionsenzymen *EcoR* I und *Mse* I. An die resultierenden DNA-Fragmente mit "sticky ends" werden spezifische Adapter liegiert. Primer mit einer von dem Adapter und der Restriktionsschnittstelle abgeleiteten Sequenz plus einer selektiven Base werden für eine Preamplifikations-PCR genutzt. Diese dient als Template in der selektiven PCR mit drei variablen selektiven Basen am 3'-Ende. Die Analyse erfolgt im Polyacrylamidgel.

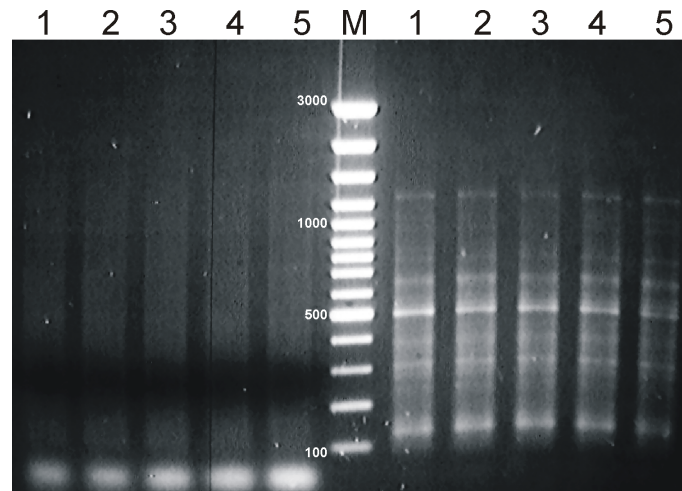


Abb. 3.17: Überprüfung der AFLP-Prozedur
Links Verdau und Ligation Pflanze 1 - 5; rechts Preamplifikation
Pflanze 1 - 5;

3.2.3 Silberfärbung der AFLP-Profile

Die AFLP-DNA-Profile wurden mit einer Silberanfärbung nach BASSAM et al. (1991) visualisiert.

Bei der von der Photochemie abgeleiteten Silberfärbung von DNA binden Silberionen an die Nucleinsäuren und werden anschließend unter alkalischen Bedingungen durch Formaldehyd zu metallischem Silber reduziert. Die Sensitivität wird von BASSAM et al. (1991) mit 1 pg DNA/mm² angegeben.

Die Silberfärbung wird direkt im Anschluss an die Gelelektrophorese durchgeführt. Dabei bleibt die nur 0,4 mm starke Gelmatrix auf einer Glasplatte fixiert. Die Färbeprozedur dauert ca. 70 min inklusive einer 20- und einer 30-minütigen Inkubation.

Die Silberfärbung führte generell zu einer sehr guten Anfärbung der DNA-Profile aus den AFLP-Reaktionen. Die angefärbten Banden setzten sich gut vom Hintergrund ab und ließen bei einer geeigneten elektrophoretischen Auftrennung eine eindeutige Auswertung zu (Abb. 3.19). Zu beachten ist aber, dass die Färbereaktion empfindlich auf nur geringe Veränderungen der beteiligten Parameter reagiert.

Im günstigsten Fall führt die Silberfärbung zu einer äußerst starken Bräunung bis Schwärzung der DNA-Banden gegenüber einem möglichst durchsichtigen und klaren Hintergrund. Im schlechtesten Fall ist eine Auswertung erschwert, wenn sich Banden nicht von einer Hintergrundfärbung abheben und/oder unscharfe Konturen aufweisen. Die Färbung der DNA reicht von einem gelblichen Hellbraun über rötliches Braun bis zu Schwarzbraun. Hierbei scheint neben der Formaldehyd-Konzentration die DNA selber ein entscheidender Faktor für die Qualität der Anfärbung zu sein. So führten AFLP-Profile mit den selben Primerkombinationen in unabhängigen Wiederholungen meist zu einer sehr ähnlichen Qualität der Anfärbung. Daneben ist die Fragmentgröße der DNA entscheidend. Je kleiner die DNA-Banden sind, desto schwächer ist ihre Anfärbung. Dies geht zusammen mit einer vermehrten Unschärfe der Konturen der kleineren DNA-Banden. So waren Banden, die kleiner als 100 bp sind, fast immer problematisch auszuwerten.

Die schwächere Anfärbung konnte zum Teil durch ein längeres Entwickeln der Färbung im unteren Geldrittel erreicht werden. Dafür wurde die Glasplatte am oberen Ende leicht aus der Entwicklerlösung gehoben und dort Essigsäure-Lösung mittels einer 5 ml Pipette zum Abstoppen der Entwicklung aufgetropft während der untere Teil des Gels weiterhin in der Entwicklerlösung verblieb.

Es ist jedoch nicht immer möglich, die genaue Ursache von Qualitätsschwankungen und Qualitätsunterschieden zumindest ohne ausführliche Kontrollexperimente zu ermitteln. Die Wasserqualität, die Qualität der Chemikalien und dabei speziell die Schwankungen bei unterschiedlichen Lieferungen einer Chemikalie, die Temperatur der Lösungen und leichte Abweichungen bei Inkubationszeiten führen so zu einer Varianz in der Anfärbungsqualität.

Ursächlich führte die Qualität der Chemikalien und Lösungen in drei Fällen zu extremen Verschlechterungen der Färbung:

1. Altes Formaldehyd führte zu starkem Hintergrund mit größeren unspezifischen Präzipitaten
2. Natriumkarbonat einer Lieferung führte zu einer äußerst schwachen Anfärbung der Banden.
3. Essigsäure einer Lieferung führte in der Stop-Reaktion zu einer sehr starken "Negativfärbung", bei der vorher stark und distinkt angefärbte Banden trüb-milchig ausbleichten.

3.2.4 Auswertung der AFLP-Reaktionen

In den AFLP-Reaktionen wurden zwischen 40 und 150 Banden amplifiziert mit einem geschätzten Durchschnitt von 60 Banden pro Reaktion (Abb. 3.19). In den mit insgesamt 256 Primerkombinationen amplifizierten unterschiedlichen AFLP-Profilen wurden damit mehr als 15.000 Banden analysiert. Die Größe der amplifizierten DNA-Fragmente lag in einem Bereich zwischen 60 und 1.200 bp. Der Großteil der Banden war jedoch kleiner als 600 bp. Darüberhinaus ließ die Reproduzierbarkeit von AFLP-Fragmenten bei einer Größe von mehr als 700 bp stark nach. Die Auftrennung von interessierenden größeren Banden konnte durch eine bis zu 4 Stunden verlängerte Elektrophorese wesentlich verbessert werden (Abb. 3.18).

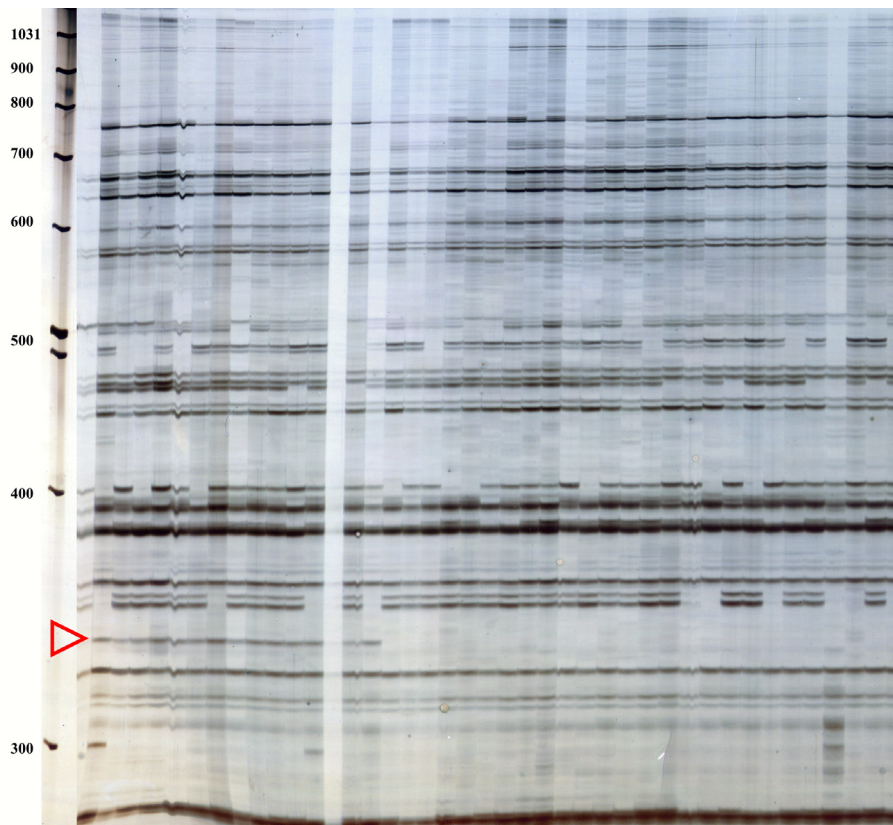


Abb. 3.18: Beispiel für eine verlängerte Gelelektrophorese zur besseren Auftrennung des interessierenden Polymorphismus CGAT 330 (roter Pfeil); Längenstandard 100 bp Leiter plus

3.2.5 DNA-Polymorphie zwischen DGV und PF

In einem ersten Schritt wurde der Polymorphiegrad der Gesamt-DNA zwischen den Eltern DGV und PF ermittelt. Hierfür wurden AFLP-Banden-Profile aus 64 Primerkombinationen untersucht. Die durchschnittliche Anzahl von distinkten Banden einer Primerkombination betrug ca. 60. Die Banden-Profile von DGV und PF zeigten ein Minimum von 4, ein Maximum von 16 und einen Durchschnitt von 8 polymorphen Banden (Abb. 3.20). Dies entspricht einem mit der AFLP-Methode detektierbaren durchschnittlichen Polymorphiegrad von mehr als 13 %.

3.2.6 Bulk Segregant-Analyse

Es wurde eine Bulk Segregant-Analyse durchgeführt, um AFLPs zu identifizieren, welche mit dem interessierenden Genort gekoppelt waren. Das Prinzip dieser Methode ist in Abb. 3.19 schematisch dargestellt (siehe auch 2.11.3). Insgesamt 40 F₂-Pflanzen waren in vier Bulks mit je 2 x 10 homozygot dominanten und 2 x 10 homozygot rezessiven *def*-Genotypen in die Analyse einbezogen. Die Bulk Segregant-Analyse wurde zuerst mit 64 Primerkombinationen durchgeführt. Dabei wurden knapp 4000 Banden analysiert. Es konnten 44 polymorphe AFLP-Banden gefunden werden, die entweder nur in den zwei DNA-Pools mit dominanten F₂-Pflanzen oder nur in den zwei DNA-Pools mit rezessiven F₂-Pflanzen amplifiziert wurden (Abb. 3.20). Die Fragmentgröße, der polymorphen Banden lag zwischen 80 bp und 800 bp. Durch die anschließende F₂-Einzelpflanzen-Analyse (siehe 3.2.7) konnte eine Kopplung aller Polymorphismen mit dem *def*-Locus bestätigt werden. 13 Banden lagen in Kopplung mit dem Mutanten- und 31 in Kopplung mit dem Wildtyp-Allel vor. Diese Polymorphismen wurden weiter analysiert.

Die Größe des genetischen Fensters der BSA kann anhand der Größe der Kopplungskarten (3.2.12.c & 3.2.12.d) geschätzt werden. Nach den von MAPMAKER mit 31,4 cM bzw. 35,8 cM angegebenen Kartengrößen sollte die Größe des genetischen Fensters nicht mehr als 40 cM betragen. Ausgehend von den von JoinMap mit 17,1 cM bzw. 16,5 cM angegebenen Kartengrößen kann die Größe des genetischen Fensters auf ca. 20 cM geschätzt werden.

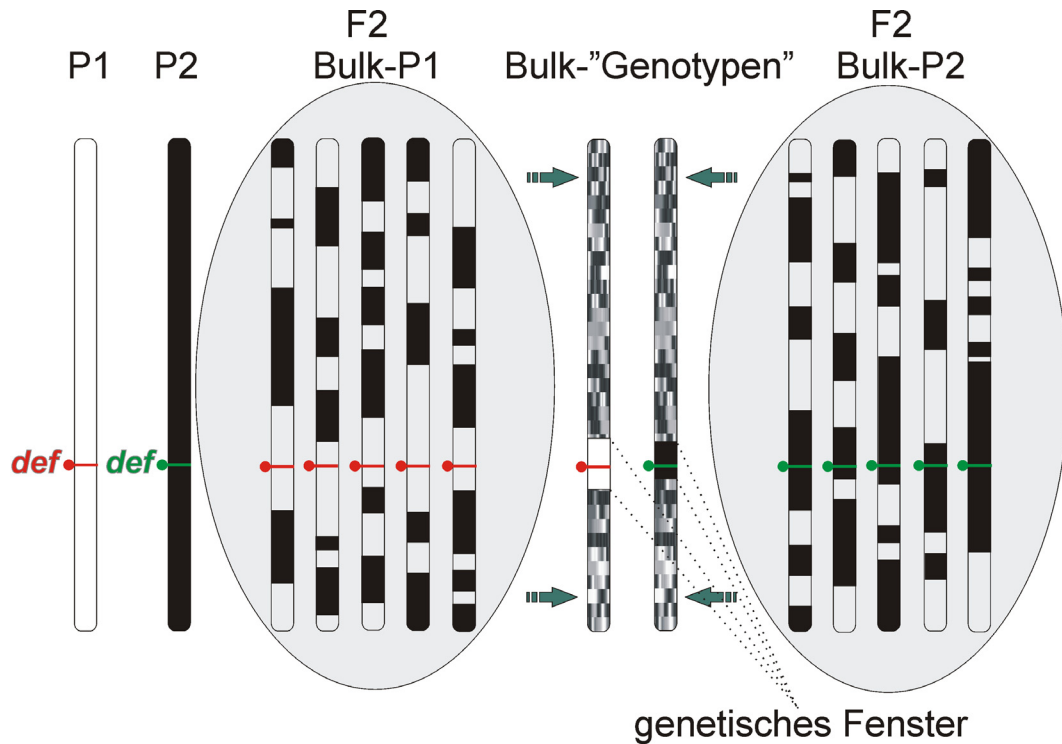


Abb. 3.19: Das Prinzip der Bulk Segregant-Analyse

P1 und P2 sind die homozygoten Eltern. Einzelne, der durch Crossover durchmischten Genotypen der F2 werden in Bulks zusammengeführt. Auswahlkriterium ist nur der Genotyp des interessierenden Locus. Im Bulk-P1 sind Pflanzen mit dem homozygoten *def*-Genotyp des Elter P1, im Bulk-P2 Pflanzen mit dem homozygoten *def*-Genotyp des Elter P2 gesammelt. In ihrem virtuellen Gesamt-„Genotyp“ enthalten beide Bulks alle Allele bis auf das sog. genetische Fenster. Nur im genetischen Fenster um das *def*-Gen ist der jeweilige reine Eltern-Genotyp vorhanden, und nur dort können zwischen den Bulks DNA-Polymorphismen detektiert werden.

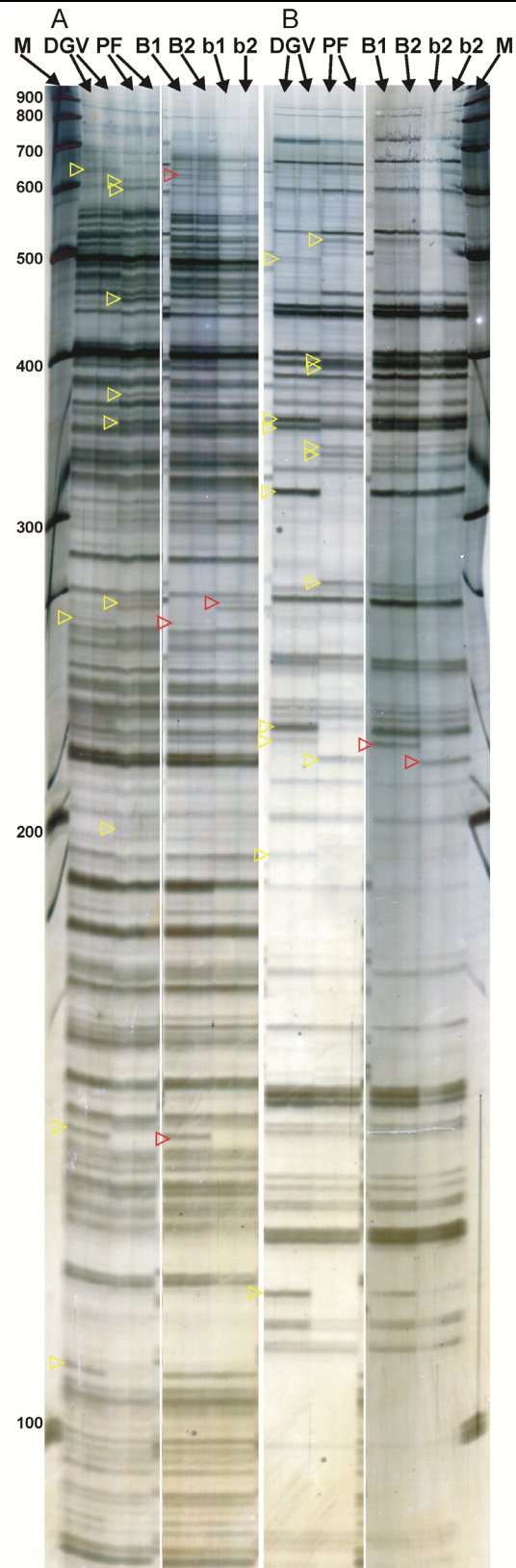


Abb. 3.20: Beispiel für die AFLP-Analyse der Eltern (Wildtyp DGV/Mutante PF) und die AFLP-Bulked Segregant Analyse mit zwei dominanten (B1/B2) und zwei rezessiven (b1/b2) Bulks; DGV und PF wurden je zweimal aufgetragen, die Bulks je einmal (siehe Zuordnung der Beschriftung durch die schwarzen Pfeile zu den einzelnen Spuren) A: Primer E-ACC x M-CTT; B: Primer E-ACT x M-CTG; Gelbe Pfeile markieren AFLPs zwischen den Eltern, rote Pfeile, die in der BSA übriggebliebenen mit *def* gekoppelten AFLPs. M: Längenstandard 100 bp-Leiter "plus"

3.2.7 F2-Einzelpflanzen-Analyse

Die Aufspaltung der in der Bulk Segregant-Analyse gewonnenen AFLP-Marker wurde weitergehend in Einzelpflanzen der F2 analysiert. Hierfür wurden AFLP-Analysen mit entweder homozygot dominanten oder homozygot rezessiven F2-Pflanzen durchgeführt. In einer ersten Analyse von 60 F2-Pflanzen konnte eine Kopplung von 38 AFLPs mit dem *def*-Locus bestätigt werden.

6 AFLPs waren in der Einzelpflanzen-Analyse nicht eindeutig auszuwerten und wurden deswegen nicht weitergehend bearbeitet.

AFLP-Marker, die bis zu diesem Punkt keine Rekombination zu dem interessierenden Genort zeigten, wurden in einer umfassenden Aufspaltungsanalyse mit bis zu 207 homozygoten F2-Pflanzen untersucht (Tab. 3.7, Abb. 3.21). Einzelne Marker rekombinierten mit dem Genort bis zu 33 mal. Alle Marker zeigten jetzt mindestens ein Rekombinationsereignis zu dem *def*-Locus und zwar in der F2-Pflanze 148. 21 der 38 AFLPs zeigten darüberhinaus eine Rekombination zum Genort in der Pflanze 98.

Tab. 3.7: Mit dem *def*-Locus gekoppelte AFLP-Marker

AFLP-Marker	In Kopplung mit Allel des Wildtyp (DGV)- oder des Mutanten (PF)-Elter	Anzahl analysierter F2-Pflanzen	Anzahl an Rekombinationen zu dem <i>def</i> -Genort	Rekombinationen in %
acac 270	PF	142	11	7,7
acac 400	PF	142	9	6,3
ACTA 190	DGV	139	13	9,3
ACTA 500	DGV	145	21	14,5
ACTT 130	DGV	204	11	5,4
actt 270	PF	203	3	1,5
ACTT 630	DGV	203	9	4,4
agag 170	PF	182	14	7,7
agag 330	PF	180	15	8,3
AGAG 420	DGV	183	12	6,6
AGAG 730	DGV	149	20	13,4
AGTA215	DGV	85	6	7,1

AFLP-Marker	In Kopplung mit Allel des Wildtyp (DGV)- oder des Mutanten (PF)-Elter	Anzahl analysierter F2-Pflanzen	Anzahl an Rekombinationen zu dem <i>def</i> -Genort	Rekombinationen in %
AGTG 150	DGV	207	3	1,4
CAAA 090	DGV	69	3	4,3
CAAA 290	DGV	76	3	3,9
CAAC 570	DGV	206	2	1,0
CTAG 220	DGV	93	7	7,5
cttg 210	PF	164	5	3,0
CTTG 220	DGV	165	2	1,2
cctg 410	PF	92	3	3,3
CGAC 350	DGV	181	9	5,0
CGAG 230	DGV	205	10	4,9
CGAT 330	DGV	206	6	2,9
CGTG 350	DGV	97	13	13,4
GCAG 210	DGV	60	7	11,7
GCAT 080	DGV	168	1	0,6
GCATT 170	DGV	156	24	15,4
gcta 350	PF	201	5	2,5
GGAC 110	DGV	144	12	8,3
GGAC 160	DGV	131	21	16,0
ggac 240	PF	145	7	4,8
GGAC 270	DGV	145	27	18,6
GGAT 470	DGV	58	4	6,7
ggat 620	PF	59	7	11,9
GGTT 270	DGV	167	4	2,4
GGTT 320	DGV	167	33	19,8
ggtt 520	PF	138	20	14,5
ggtt 780	DGV	156	12	7,7

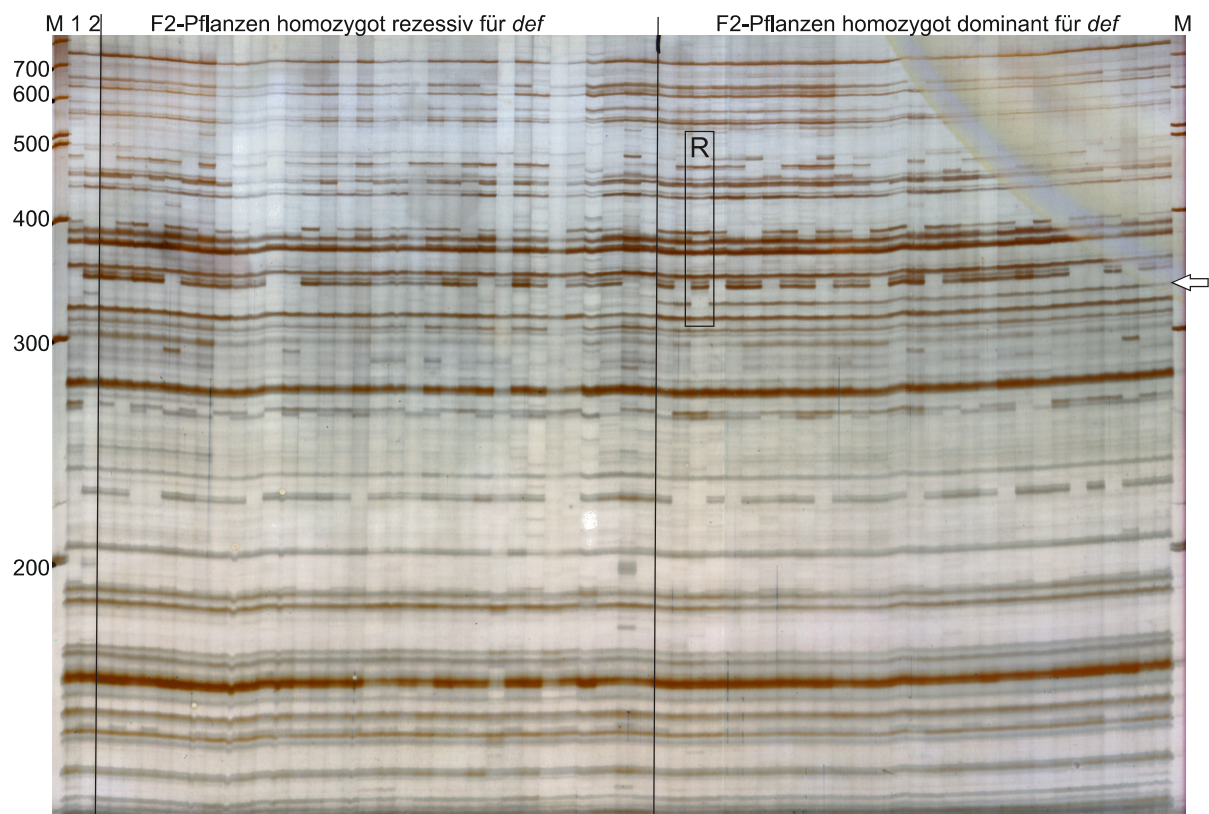


Abb. 3.21: Beispiel für F2-Einzelpflanzen-Analyse des mit dem *def*-Wildtyp-Allel gekoppelten AFLP-Markers CGAT 330 (Pfeil); von links nach rechts: Marker; AFLP-Analysen von 1: PF (Mutanten-Elter), 2: DGV (Wildtyp-Elter), 32 *def*-Mutanten der F2, 29 *def*-Wildtyp F2-Pflanzen, Marker; Beachte: Eine Doppelrekombinante R (Pflanze 148); M: 100 bp Leiter +

3.2.8 Kombinierte Bulk- und Einzelpflanzen-Analyse

Mit dem Ziel, AFLP-Marker zu finden, die in der Pflanze 148 keine Rekombination zu dem *def*-Locus zeigen, und damit näher am Genort liegen als der Kopplungsbruch dieser Pflanze, wurden AFLP-Profile mit weiteren 192 Primerkombinationen amplifiziert. Hierbei wurden die zwei dominanten und die zwei rezessiven F2-DNA-Pools und daneben die Einzelpflanze 148 analysiert. Es wurden durch die Bulk Segregant-Analyse mehr als 120 weitere DNA-Polymorphismen detektiert, von denen jedoch keiner eine Kopplung zum *def*-Locus in der Pflanze 148 zeigte.

3.2.9 Umwandlung von AFLP-Markern in sequenzspezifische Marker (STS-Marker)

Es wurde versucht, AFLP-Marker in sequenzspezifische Marker (Sequence Tagged Site-Marker, STS-Marker) umzuwandeln. Hierbei werden polymorphe DNA-Banden aus der Gel-Matrix gelöst, reamplifiziert, kloniert und sequenziert. Von den Sequenzen werden Primer-Oligonukleotide für sequenzspezifische PCR-Amplifikationen abgeleitet. Im Falle eines STS-Markers ist es dann möglich, den ursprünglichen Polymorphismus aus der AFLP-Analyse auch mit der spezifischen PCR zu reproduzieren.

Zu beachten ist, dass sich hinter einer Bande im Gel mehrere DNA-Sequenzen gleicher Fragmentgröße verbergen können. Dies kann zur Klonierung einer Hintergrund-Bande führen, die nicht dem Original-Polymorphismus entspricht. Darüberhinaus können Polymorphismen der AFLP-Analyse bei einer sequenzspezifischen PCR verloren gehen, wenn der DNA-Polymorphismus in der Restriktionsschnittstelle oder den anschliessenden selektiven Basenpaaren liegt. In einem solchen Fall kann es passieren, dass der in 3'-Richtung verlängerte Primer trotz des Polymorphismus bindet. Dies führt zur Amplifikation von einer Bande in beiden Genotypen.

Es wurden 12 Marker-Banden für eine Umwandlung in STS-Marker verwendet.

Das präzise Ausschneiden der DNA-Banden aus dem getrockneten Polyacrylamidgel war ohne weiteres möglich. Aufgrund der Silberanfärbung waren die Banden eindeutig zu identifizieren und ein Mitausschneiden angrenzender Banden weitestgehend auszuschließen.

Die Elution der DNA aus den Gelfragmenten durch simple einstündige Inkubation in TE-Puffer erwies sich als absolut unproblematisch.

Die Reamplifikation der Banden führte in allen Fällen zu einer Bande der erwarteten Größe. Darüberhinaus wurden in einigen Fällen noch eine Anzahl kleinerer Banden amplifiziert (Abb. 3.22). Aus diesem Grund wurde die Reamplifikation elektrophoretisch aufgetrennt und nur die Bande mit der erwarteten Größe aus dem Gel extrahiert und kloniert.

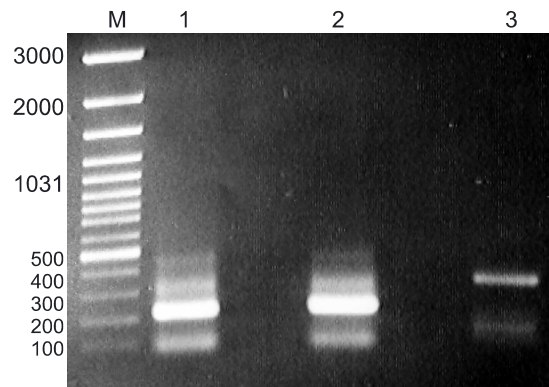


Abb. 3.22: Beispiel für die Reamplifikation interessanter AFLP-Banden; von links nach rechts: Marker; Reamplifikation von 1cttg 210, 2 CTTG 220 und 3 gcta 350; Längenstandard 100 bp Leiter +

Die Sequenzierungen der Banden ergaben eine recht unterschiedliche Anzahl verschiedener Sequenzen, die sich hinter einer Bande verbergen konnten. So wurde im Falle der AFLP-Bande "ACTT 130" bei 6 Sequenzierungen immer die gleiche Sequenz gefunden, während bei der AFLP-Bande "AGTG 150" bei 5 Sequenzierungen 4 unterschiedliche Sequenzen angetroffen wurden (Tab. 3.8).

Tab. 3.8: Umwandlung von AFLP Loci in STS-Marker. Loci, die mit Nein* bezeichnet, sind konnten in ssAFLPs umgewandelt werden (siehe 3.2.10)

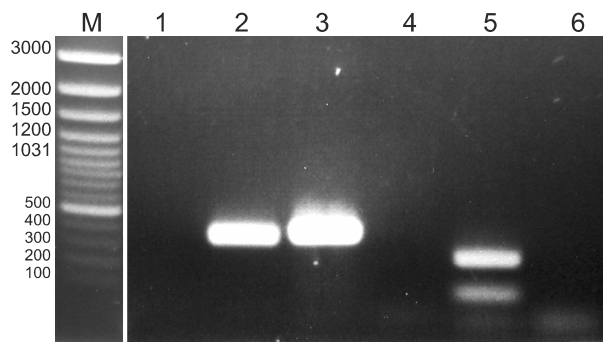
Name AFLP-Marker	Anzahl unabhängiger Reamplifikationen & Klonierungen	Anzahl Sequenzierungen	Anzahl unterschiedlicher Klone	Anzahl abgeleiteter Primerpaare	sequenzspezifischer Polymorphismus (STS)
ACTT 630	1	4	1	1	Nein
ACTT 130	2	6	1	1	Nein*
AGTG 150	1	5	4	2	Nein*
CAAC 570	3	10	5	3	Nein*
CGAC 350	1	3	2	2	Ja
CGAG 230	2	6	3	3	Ja
CGAT 330	2	5	1	2	Nein
CTTG 220	1	3	2	2	Nein
GGTT 270	1	2	1	1	Nein
actt 270	1	3	1	1	Nein*

Name AFLP-Marker	Anzahl unabhängiger Reamplifikationen & Klonierungen	Anzahl Sequenzierungen	Anzahl unterschiedlicher Klone	Anzahl abgeleiteter Primerpaare	sequenzspezifischer Polymorphismus (STS)
cttg 210	1	1	1	1	Nein*
gcta 350	2	5	2	1	Ja

Bei den AFLP-Banden "CGAC 350", "CGAG 230" und "gcta 350" war es möglich, den ursprünglichen Polymorphismus mit den sequenzspezifischen Primern zu reproduzieren. Diese AFLP-Marker konnten somit in STS-Marker umgewandelt werden. Sie wurden "STS-CGAC 350", "STS-CGAG 230" und "STS-gcta 350" genannt. Alle drei STS-Marker sind dominante Marker. STS-CGAC 350 und STS CGAG 230 liegen mit dem *def*-Allel des Wildtyps (DGV) und STS-gcta 350 mit dem *def*-Allel der Mutante (PF) in Kopplung vor (Abb. 3.23, Tab. 3.9). Bei 10 weiteren analysierten Banden konnte der ursprüngliche Polymorphismus mit den spezifischen Primern jedoch nicht reproduziert werden. Hier wurde mit den spezifischen Primern sowohl bei DGV als auch bei PF ein DNA-Fragment gleicher Größe amplifiziert.

Tab. 3.9: Dominante STS Marker mit Angabe der Kopplungsphase und der paarweisen Entfernung zum *def* Gen

STS Marker	Primer Sequenzen (5' - 3')	Spezifisch für <i>def</i> DGV- oder PF-Allel	Zweipunkt-Entfernung zum <i>def</i> -Gen in cM
STS-CGAC-350	L: GAATTCACGTAGTTGGTTTTAC R: TTAACACAGTTTTTTATAAAGTAACTC	DGV	4,5
STS-CGAG-230	L: GAATTCACGGTTGGAAGCTG R: TTAACAGTCATGTCTGCTC	DGV	4,5
STS-gcta-350	L: GAATTCAGCAGCAGAGAAA R: TTAACTATTCAAATATTGCAA	PF	2,9

**Abb. 3.23:** Sequence Tagged Sites (STS)

Die mit dem *def*-Genort gekoppelten dominanten Marker können mit sequenzspezifischen Primern direkt aus genomischer DNA amplifiziert werden.

Spur 1, 3 & 5: DGV (Wildtyp-Elter); Spur 2, 4 & 6: PF (Mutanten-Elter); 1/2: STS-gcta 350; 3/4: STS-CGAC 350; 5/6: STS-CGAG 230; M: 100 bp Leiter +

3.2.10 Umwandlung von AFLP-Markern in sequenzspezifizierte AFLP-Marker

Die Mehrzahl der AFLP-Marker ließ sich in den durchgeführten Versuchen nicht in STS-Marker umwandeln.

Eine dies Phänomen erklärende Annahme ist, dass den AFLP-Markern häufig eine Punktmutation in oder an der Restriktionsschnittstelle zugrunde liegt, welche bei der AFLP-Prozedur bei einem der untersuchten Eltern zum Verlust der Restriktion an dieser Stelle führt. Solch ein Polymorphismus kann jedoch bei Einsatz spezifischer Primer, die weit über die ursprüngliche Schnittstelle in den 3'-Bereich hineinragten, verloren gehen.

Aus diesem Grund wurden aus den gewonnenen Sequenzinformationen Primer abgeleitet, die der originalen AFLP-Primer-Sequenz entsprachen, die aber am 3'-Ende um zwei bis fünf spezifische Basenpaare der Sequenz verlängert wurden. Mit diesen sequenzspezifizierten Primern wurde eine PCR durchgeführt, bei der als Template, wie in dem AFLP-Protokoll, die Preamplifikations-PCR eingesetzt wurde. Durch die sequenzspezifizierten Primer wurde jetzt jedoch nur noch ein spezifisches Fragment amplifiziert. Entsprach dieses Amplifikat dem ursprünglichen AFLP-Marker, kann dieser jetzt singular amplifiziert und in einem einfachen

Agarosegel ausgewertet werden. 5 AFLPs konnten so in sequenzspezifizierte ssAFLP-Marker umgewandelt werden (Tab. 3.10; Abb. 3.24 - Abb. 3.28).

Tab. 3.10: Dominante ssAFLP Marker mit Angabe der Kopplungsphase und der paarweisen Entfernung zum *def* Gen

ssAFLP Marker	Primer Sequenzen (5' - 3'), zusätzliche spezifizierende Basen unterstrichen	Spezifisch für <i>def</i> DGV- oder PF-Allel	Zweipunkt-Entfernung zum <i>def</i> -Gen in cM
ssACTT-130	L: GCGTACCAATTCAACA <u>AAAC</u> R: GAGTCCTGAGTAACTT <u>GT</u> A	DGV	5,0
ssAGTG-150	L: TGCGTACCAATTCAAGA <u>AAG</u> R: TGAGTCCTGAGTAACTG <u>GC</u>	DGV	1,6
ssCAAC-570	L: TGCGTACCAATTCACAC <u>CT</u> R: TGAGTCCTGAGTAAACAC <u>AG</u>	DGV	1,2
ssactt-270	L: TGCGTACCAATTCAACG <u>TC</u> R: TGAGTCCTGAGTAACTT <u>GG</u>	PF	1,8
sscttg-210	L: CGTACCAATTCACTA <u>AATC</u> R: GAGTCCTGAGTAACTG <u>GA</u>	PF	5,6

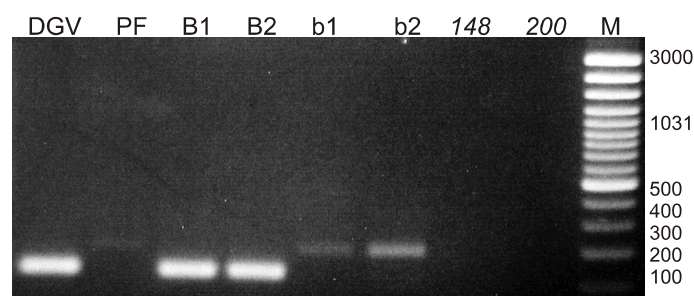


Abb. 3.24: ssAFLP-Marker ssACTT 130
Von links nach rechts: Eltern DGV (WT) PF (M), dominante Bulks: B1/2, rezessive Bulks: b1/2, Doppelrekombination in der dominanten F2-Pflanze 148, rezessive F2-Pflanze 200; M: 100 bp Leiter +

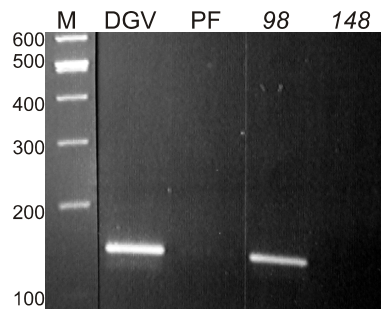


Abb. 3.25: ssAFLP-Marker ssAGTG 150
 Von links nach rechts: Eltern DGV (WT) PF (M), Rekombination in der rezessiven F2-Pflanze 98, Doppelrekombination in der dominanten F2-Pflanze 148; M: 100 bp Leiter +

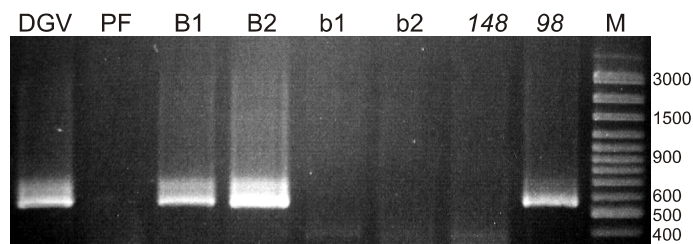


Abb. 3.26: ssAFLP-Marker ssCAAC 570
 Von links nach rechts: Eltern DGV (WT) PF (M), dominante Bulks: B1/2, rezessive Bulks: b1/2, Doppelrekombination in der dominanten F2-Pflanze 148, Rekombination in der rezessiven F2-Pflanze 98; M: 100 bp Leiter +

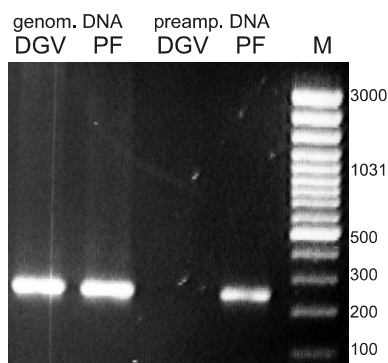


Abb. 3.27: ssAFLP-Marker ssactt 270
 Von links nach rechts: Verlust des AFLP-Markers bei STS-PCR aus genomischer DNA der Eltern DGV (WT), PF (M), sequenzspezifizierte PCR aus AFLP-Preamplifikations-DNA von DGV und PF; M: 100 bp Leiter +

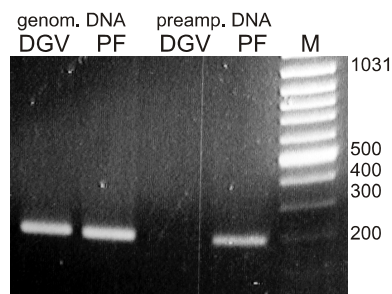


Abb. 3.28: ssAFLP-Marker ssettg 210
 Von links nach rechts: Verlust des AFLP-Markers bei STS-PCR aus genomischer DNA der Eltern DGV (WT), PF (M), sequenzspezifizierte PCR aus AFLP-Preamplifikations-DNA von DGV und PF; M: 100 bp Leiter +

3.2.11 Rekombinationsfrequenzen der Marker zu dem *def*-Genort

Die paarweisen Rekombinationsfrequenzen (R_f) und die genetische Entfernung in centiMorgan (cM) aller AFLP-Marker zu dem *def*-Genort wurden parallel mit MAPMAKER 3.0 und JoinMap 3.0 ermittelt. Es wurde hierbei die Kosambi-Kartierungsfunktion (KOSAMBI, 1944) eingesetzt, die neben der Tatsache, dass rekombinante Gameten aus jeder ungeraden und parentale Gameten auch aus jeder geraden Anzahl an "Crossing Over"-Ereignissen zwischen zwei Loci hervorgehen können, positive Interferenz (ein Crossing Over Ereignis macht ein weiteres Crossing Over in der näheren Umgebung weniger wahrscheinlich) voraussetzt und berücksichtigt.

Die paarweisen R_f -Ergebnisse von MAPMAKER 3.0 und JoinMap 3.0 stimmten exakt überein. Die LOD-Werte wurden von JoinMap übernommen, da sie dort unabhängig von Abweichungen erwarteter Aufspaltungen berechnet wurden.

Insgesamt verteilen sich die Marker über eine genetische Distanz von 0,8 bis 19,6 cM zum *def*-Locus. Zwei Marker CTTG 220 und GCAT 080 liegen weniger als 1 cM vom interessierenden Genort entfernt (Tab. 3.11).

Tab. 3.11: Paarweise Rekombinationsfrequenzen und Entfernung in centiMorgan der Marker-Loci zum *def*-Locus

AFLP-Marker	Rekombinationsfrequenz zum Def-Genort	Entfernung zum Def-Genort in centiMorgan	LOD
CTTG 220	0,008	0,8	39,33
GCAT 080	0,009	0,9	42,99
CAAC 570	0,012	1,2	76,28
AGTG 150	0,016	1,6	54,51
actt 270	0,018	1,8	53,68
GGTT 270	0,022	2,2	37,78
gcta 350	0,029	2,9	50,42
CGAT 330	0,029	2,9	49,9
CAAA 090	0,030	3,0	13,83
CAAA 290	0,040	4,0	25,25
ACTT 630	0,043	4,3	45,29
CGAG 230	0,045	4,5	45,19
CGAC 350	0,045	4,5	39
cctg 410	0,048	4,9	19,6
ACTT 130	0,049	5,0	43,87
cttg 210	0,055	5,6	33,37
AGAG 420	0,056	5,6	36,36
AGTA 215	0,061	6,1	15,54
CTAG 220	0,061	6,3	15,98
GGAC 110	0,066	6,6	24,75
ggac 240	0,07	7,1	27,78
ACTA 190	0,07	7,1	24,81
GGAT 470	0,078	7,8	11,34
CGAT 330	0,102	10,4	12,9
agag 170	0,111	11,3	29,94
ACTA 500	0,112	11,4	19,76
acac 400	0,113	11,5	21,26
agag 330	0,116	11,8	29,19
ggat 620	0,119	12,1	9,84

AFLP-Marker	Rekombinationsfrequenz zum Def-Genort	Entfernung zum Def-Genort in centiMorgan	LOD
GCAT 170	0,119	12,2	20,44
GCAG 210	0,12	12,2	9,33
ggtt 780	0,122	12,5	22,81
AGAG 730	0,124	12,6	17,23
GGAC 160	0,126	12,9	16,95
acac 270	0,135	13,8	18,24
GGAC 270	0,145	15	15,71
GGTT 320	0,15	15,5	18,73
ggtt 520	0,186	19,6	14,8

3.2.12 Multipunktanalyse zur Erstellung von Kopplungskarten

In der vorliegenden Arbeit wurden aufgrund der Schwierigkeiten, in Repulsion vorliegende dominante Marker zu analysieren (SÄLL und NILSSON, 1994; KNAPP et al., 1995), zwei getrennte Karten erstellt. Eine Karte für die in Kopplung mit dem *def*-Wildtypallel des Elters DGV und eine Karte für die in Kopplung mit dem *def*-Mutantenallel des Elters PF auftretenden AFLP-Marker.

Zur Erstellung von Kopplungskarten für die untersuchten Loci wurden parallel die Programme MAPMAKER 3.0 und JoinMap 3.0 verwendet. Es wurde mit der Kosambi-Kartierungsfunktion gearbeitet (KOSAMBI, 1944).

3.2.12.a Vorgehensweise in MAPMAKER

Die Vorgehensweise mit dem Programm MAPMAKER ist zusammengefasst wie folgt:

1. Zweipunktanalyse aller Loci zur Kalkulation der paarweisen Rekombinationsfrequenzen und der dazugehörigen LOD-Werte.
2. Etablierung von Kopplungsgruppen.
3. Interaktive Feststellung einer geeigneten Startsequenz von bis zu maximal 6 Loci mit

dem Befehl “compare”. Dabei werden die Wahrscheinlichkeiten aller möglichen Reihenfolgen einer Auswahl von Loci ermittelt. Die wahrscheinlichste Reihenfolge erhält den Wert 0. Für jede weniger plausible Reihenfolge wird der Logarithmus ihrer Wahrscheinlichkeit (log-likelihood) relativ zur besten Reihenfolge angegeben. Ist die zweitbeste Reihenfolge z. B. 1.000.000 fach unwahrscheinlicher als die beste, erhält sie den log-likelihood - 6,0 (10^6 fach unwahrscheinlicher). Der Benutzer muss sich dann für eine gute Auswahl mit einer möglichst großen Differenz der Wahrscheinlichkeiten zwischen der besten und der zweitbesten Reihenfolge entscheiden. Diese bildet schließlich eine Art Rahmen oder Gerüst für die nächsten Schritte.

4. Interaktive Platzierung weiterer Loci an jeder möglichen Position und Angabe des jeweiligen log-likelihoods mit dem Befehl “try”. Integration der Loci in die Vorauswahl bei Unterstützung der besten Position durch einen log likelihood der zweitbesten Position von $< -3,0$ (die zweitbeste ist > 1.000 fach unwahrscheinlicher als die beste Position).
5. Überprüfung der Wahrscheinlichkeiten der erweiterten Karten mit dem Befehl “ripple”.
6. Mit den Befehlen “three point” und “order” kann eine Kopplungskarte auch automatisierter erstellt werden. Dies führt zu ähnlichen Resultaten wie das interaktive Vorgehen. Es wurde in der vorliegenden Arbeit aber nur als Kontrolle durchgeführt, da es bei Wiederholungen zu jeweils leicht abweichenden Ergebnissen kommt.

Insgesamt wurden mit MAPMAKER Karten erstellt, die mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit der realen Anordnung entsprechen. Dabei wurden jedoch viele Loci ausgeschlossen, die mit höchster Sicherheit in dem Kartenintervall positioniert sind, deren exakte Position aber nicht mit genügendem log likelihood-Wert bestimmt werden konnte. Konnte für eng mit dem *def*-Genort gekoppelte und damit wertvolle Marker eine Platzierung in einem Intervall (log likelihood $< -3,0$) angegeben werden, so wurde dies in der Darstellung der Kopplungskarte integriert.

3.2.12.b Vorgehensweise in JoinMap

Die Vorgehensweise mit dem Programm JoinMap ist zusammengefasst wie folgt:

1. Zweipunktanalyse aller Loci zur Kalkulation der paarweisen Rekombinationsfrequenzen und der dazugehörigen LOD-Werte wie bei MAPMAKER.
2. Etablieren von Kopplungsgruppen.
3. Automatisches sequentielles Erstellen der Karte.
 - (a) Auswahl der zwei informativsten Loci (höchster LOD-Wert bei der paarweisen Rekombinationsfrequenz) und Kalkulation ihrer Kartendistanz.
 - (b) Addition des Locus mit dem nächsthöchsten LOD-Wert.
 - (c) Feststellung der besten Position des Locus in der vorhandenen Karte und des dazugehörigen Goodness-of-Fit-Wertes, des “jumps”. Überschreitet der “jump” einen Schwellenwert (Voreinstellung ist 5,0; in der vorliegenden Arbeit wurde jedoch ein sehr viel stringenterer Wert von 1,0 gewählt) wird der Locus nicht zur Karte hinzugefügt.
 - (d) Überprüfen einer möglichen besseren Neuordnung der Karte nach Addition des Locus mittels der “ripple”-Funktion.
 - (e) Wiederholung ab 3(b).
 - (f) Erstellen einer 1. Karte; Beenden der ersten Runde.
4. Einmalige Wiederholung ab 3(b) mit allen in 3(c) nicht integrierten Loci. In dieser sog. zweiten Runde können zumeist weitere Loci zur Karte hinzugefügt werden, die noch in der ersten Runde ausgeschlossen worden waren. Es wird hier eine 2. Karte erstellt. Die angebotene Möglichkeit einer dritten Runde, in der alle übrigen Loci in die Karte integriert werden, ohne auf den Goodness-of-Fit-Wert zu achten, wurde in der vorliegenden Arbeit ausgeschlossen.

Der gesamte Prozess der Kartenerstellung mit JoinMap läuft automatisch ab und nur einzelne Parameter wie z. B. der “jump” Schwellenwert können variiert werden. Der Prozess der Kartenerstellung wird aber gespeichert und kann als “session log” nachvollzogen werden. Im Gegensatz zu MAPMAKER legt JoinMap weniger Wert auf die exakte Positionierung der Loci als auf eine möglichst vollständige Integrierung aller Loci, die auf jeden Fall in der Kopplungsgruppe lokalisiert sind.

3.2.12.c Karten der in Kopplung mit dem Wildtypallel des *def*-Genortes vorliegenden Marker

Es wurden 26 in Kopplung mit dem DGV-Wildtypallel des *def*-Locus auftretende AFLP-Marker in die Kopplungsanalyse einbezogen.

Mit MAPMAKER konnten bei einem Schwellenwert-log likelihood von -3.0 12 AFLP-Loci und der *def*-Genort in einer Kopplungskarte integriert werden. Sie erstreckt sich über eine genetische Distanz von 31,4 cM. Die minimale Distanz zwischen zwei Loci, zwischen CAAC 570 und dem *def*-Locus beträgt 1,1 cM. Der Arbeitsweise des Programms entsprechend sind die Loci insgesamt in relativ gleichmäßigen Abständen über die gesamte Distanz verteilt. Für vier weitere Loci, die eng mit dem *def*-Locus gekoppelt vorliegen, kann mit einem log likelihood von -3.0 ein Intervall angegeben werden, in dem diese Marker-Loci platziert sind (Abb. 3.29).

Mit JoinMap konnte bei einem Goodness-of-Fit-Wert ("jump") von <1 eine Kopplungskarte mit 17 AFLP-Loci und dem *def*-Locus erstellt werden. Diese Karte wiederholt die mit MAPMAKER kalkulierte Anordnung der Marker. Darüberhinaus integriert JoinMap weitere 5 AFLP-Loci, von denen 4 in der nächsten Umgebung des *def*-Genortes liegen.

Der entscheidende Unterschied der von JoinMap kalkulierten Karte gegenüber der mit Mapmaker erstellten Karte ist die viel geringere genetische Distanz innerhalb derer die Loci angeordnet wurden. Sie beträgt mit 17,1 cM gegenüber 31,4 cM nur fast die Hälfte der Karte von MAPMAKER (Abb. 3.29).

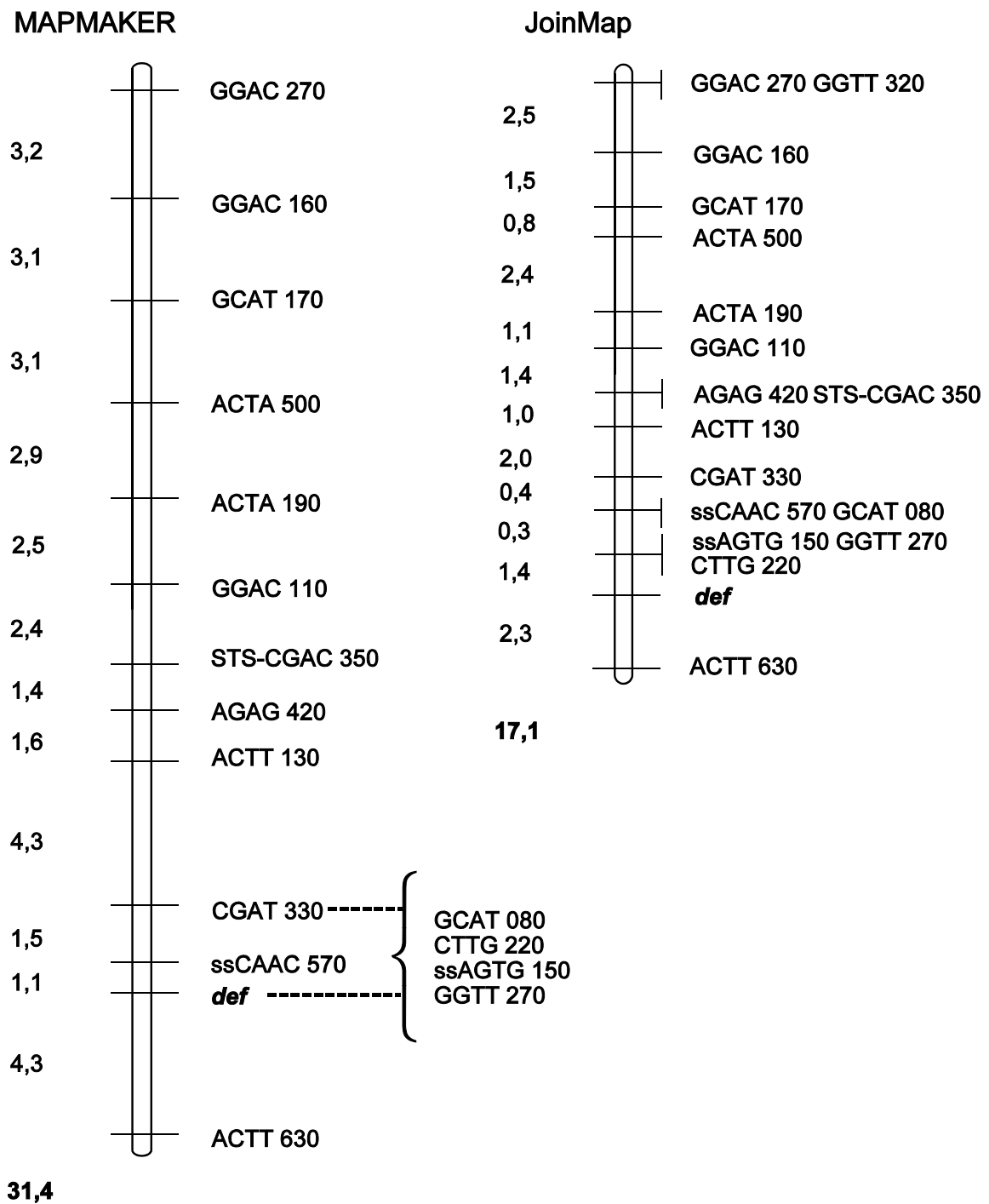


Abbildung 3.29: Karten der in Kopplung mit dem *def*-Wildtyp-Allel des Elter DGV auftretenden Marker-Loci mit MAPMAKER 3.0 (links) und JoinMap 3.0 (rechts).

Abstände in cM links neben den Karten; Gesamtlänge der Karten unten. In einem Intervall zwischen dem *def*-Locus und dem Marker CGAT 330 (gekennzeichnet mit gestrichelten Linien) können 4 weitere Marker (hinter der Klammer) mit dem Programm MAPMAKER platziert werden.

3.2.12.d Karten der in Kopplung mit dem Mutantenallel des *def*-Genortes vorliegenden AFLP-Marker

Es wurden 12 in Kopplung mit dem PF-Mutantenallel des *def*-Locus auftretende AFLP-Marker in die Kopplungsanalyse einbezogen.

Mit MAPMAKER konnten 5 AFLP-Loci und der *def*-Genort bei einem Schwellenwert-log likelihood von -3.0 in einer Kopplungskarte integriert werden. Sie erstreckt sich über insgesamt 35,8 cM, 16,7 cM zur einen und 19,1 cM zur anderen Seite des *def*-Locus. Der am nächsten zum *def*-Genort platzierte Marker liegt mit 5,5 cM relativ weit entfernt. Drei zusätzliche Marker-Loci können jedoch in einem den *def*-Locus einschließenden Intervall platziert werden (Abb. 3.30).

Mit JoinMap wurden 8 AFLP-Marker und der *def*-Genort in einer Kopplungskarte integriert. Die AFLP-Loci liegen alle auf einer Seite des *def*-Locus. Die Gesamt-Distanz der Karte beträgt 16,5 cM. Im Vergleich zu der Karte von MAPMAKER ist hier bei JoinMap wiederum die Größe der Karte wesentlich geringer (Abb. 3.30). Vergleicht man jedoch die Größe der JoinMap-Karte mit der Größe des entsprechenden Teilstückes der MAPMAKER-Karte (*def* bis gggt520), so weisen die verglichenen Bereiche mit 19,1 cM (MAPMAKER) und 16,5 cM (JoinMap) eine wesentlich bessere Übereinstimmung auf.

Bei einem weniger exklusiven Goodness-of-Fit-Wert ("jump") von 5,0 werden auch von JoinMap 3 zusätzliche Marker auf der anderen Seite des *def*-Locus in der Karte integriert. Alle AFLP-Loci der Karte aus MAPMAKER liegen dann in der gleichen Reihenfolge auch in der JoinMap-Karte vor.

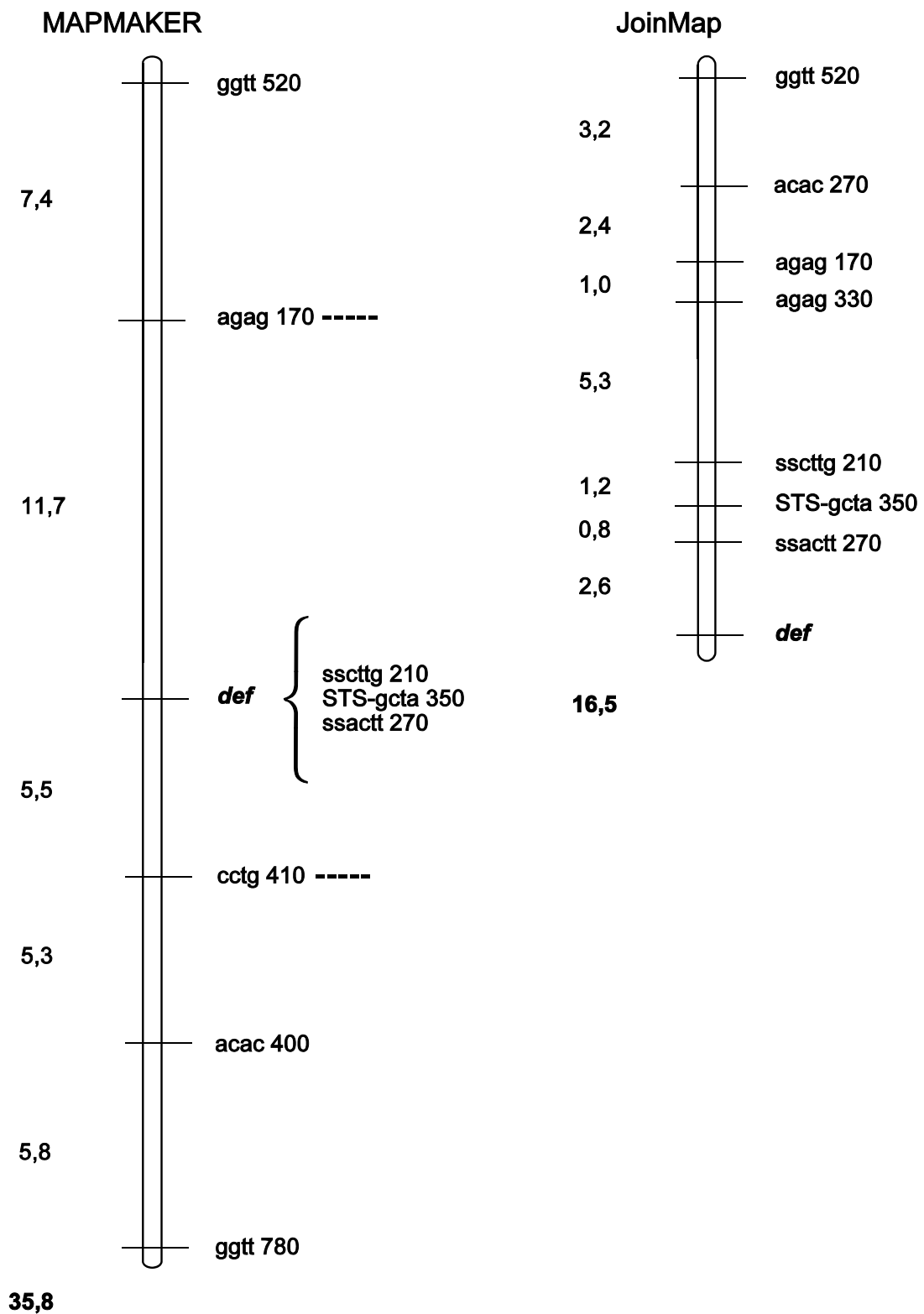


Abbildung 3.30: Karten der in Kopplung mit dem *def*-Mutanten-Allel des Elter PF auftretenden Marker-Loci mit MAPMAKER 3.0 und JoinMap 3.0; Abstände in cM links neben den Karten; Gesamtlänge der Karten unten. In einem Intervall zwischen den dem *def*-Locus benachbarten Loci (gekennzeichnet mit gestrichelten Linien) können 3 weitere Marker (hinter der Klammer) mit dem Programm MAPMAKER platziert werden.

4. Diskussion

Die Klonierung und molekulare Charakterisierung von Genen erfolgt zur Zeit vor allem über einen der drei folgenden Wege:

1. Positionsklonierung

Dieser Weg benötigt zunächst eine hochauflösende genetische Karte der nächsten Umgebung des interessierenden Genortes, welche in einem zweiten Schritt in eine aus einem Contig aus überlappenden YAC- oder BAC-Klonen bestehende physikalische Karte überführt wird, die die entsprechende chromosomale Region überspannt. In dem so genannten "Chromosome walking"-Schritt werden dann mögliche Gen-Kandidaten in einer Kombination aus Subklonierung und Sequenzierung dieses Contigs identifiziert.

2. Detektion von Orthologen

Für diese Methode dienen als Ausgangspunkt sequenzierte Gene oder Proteine anderer Spezies mit möglichst ähnlicher Funktion wie der des interessierenden Gens. Konservierte Domänen dieser Proteine oder Konsensus-Bereiche einer Anzahl homologer Nukleinsäure-Sequenzen werden zur Ableitung von Primern-Sequenzen genutzt und in der interessierenden Spezies in PCRs eingesetzt (ROSE et al., 1998). Diesem Ansatz liegt die Überlegung zu Grunde, dass orthologe Gene zwischen verschiedenen Spezies gefunden werden können, welche sich durch ähnliche Funktionen auszeichnen (MORANT et al., 2002).

3. Detektion von spezifisch exprimierten Genen über die Analyse differentieller Expression

Die Klonierung erfolgt hier durch die Isolierung und Anreicherung von differentiell exprimierten mRNAs. Es ist damit keine direkte Fokussierung auf nur ein Gen möglich, sondern

das Ziel ist die Klonierung von spezifischen Genen für z. B. bestimmte Gewebe oder Entwicklungsstadien.

In der vorliegenden Arbeit haben wir uns dafür entschieden, mit zwei dieser Strategien vorzugehen, und zum einen für das *def*-Gen eine möglichst hochauflösende genetische Karte als Ausgangspunkt für eine kartengestützte Klonierung zu entwickeln, und zum zweiten eine Analyse von spezifisch während der Blüteninitiation exprimierten Genen durchzuführen, die als Folge einer Mutation des *Lf*-Locus differentiell exprimiert werden.

Der Vorteil einer Positionsklonierung ist, dass direkt nur auf ein interessierendes Gen zugearbeitet wird. Nachteil ist, dass dies vor allem bei großen Genomen eine sehr zeitaufwendige Methode ist. Das *def*-Gen eignet sich gut für diesen Ansatz, da es einem monogenen dominant/rezessiven Erbgang folgt und sein Phänotyp auch in stark heterozygotem Hintergrund klar erfasst werden kann.

Die Mutante 46A unterscheidet sich von ihrem Wildtyp abgesehen von stillen Mutationen nur durch die Mutation des *Late Flowering* Gens. Expressionsunterschiede beim Vergleich des unterschiedlichen Blühverhaltens von Wildtyp und Mutante stehen damit direkt und indirekt in Zusammenhang mit der Mutation. Die durchgeführte Expressionsanalyse auf Ebene der Transkription sollte zu transkribierten Genfragmenten (ESTs, expressed sequence tags) führen, die direkt die Klonierung entsprechender Gene ermöglichen. Posttranslationale Modifikationen, die auch zu differentieller Expression führen können, konnten hiermit jedoch nicht erfasst werden. Weiterhin ließ sich auch keine Aussage über die Wahrscheinlichkeit treffen, das *Lf*-Gen selber zu finden.

4.1 Expressionsanalyse der Blüteninitiation mittels verschiedener *Late Flowering*-Genotypen

Nach ausführlicher klassischer Charakterisierung durch Kreuzungs- und Pfropfungsexperimente (MURFET, 1990; WELLER et al., 1997) steht für ein weiteres Verständnis der Blüte der Erbse vor allem eine molekulare Analyse der involvierten Gene aus. Unter den 10 bekannten Blüh-Genen der Erbse fällt dem *Late Flowering* Locus bei der Kontrolle der Blüteninitiation eine entscheidende Rolle zu. Seine Funktion als Blührepressor unterscheidet ihn klar von anderen Blühgenen. Während in der Modell-Pflanze *Arabidopsis thaliana* mittlerweile eine zunehmende Zahl an Genen kloniert worden ist, ist dies bisher bei keinem der gut charakterisierten Blühgene der Erbse gelungen. Deswegen war es Ziel der durchgeführten Arbeiten, wenn möglich, molekulare Informationen über mit der Blüte in Zusammenhang stehende Gene unter besonderer Berücksichtigung des *Lf*-Locus zu gewinnen.

Für die Analyse wurde Gewebe des Spross-Apex ausgewählt, da sich die entscheidenden Veränderungen bei der Blüteninitiation zuerst im Spross-Apex-Meristem (SAM) vollziehen (SIMPSON et al., 1999). Das vegetative Programm des SAMs, welches laterale Organe wie Blätter, und basal den Stamm aus seinen pluripotenten Stammzellen hervorbringt, muss als erstes auf den Blüteninitiations-Prozess (Floral initiation Process, FLIP) umgeschaltet werden. Der FLIP resultiert in der Abgliederung von Blühmeristemen aus dem SAM, die durch die Ausbildung der Blütenorgane zu einschneidenden Veränderungen der Morphologie im Spross-Apex führen (PIDKOWICH et al., 1999).

Darüberhinaus wird für den *Lf*-Locus eine Aktivität im Spross-Apex angenommen (MURFET, 1971).

Durch einen Vergleich der Expressionmuster des Spross-Apex von Wildtyp und frühblühender Mutante sollten Unterschiede, die durch die Initiation der Blüte hervorgerufen werden, detektiert werden.

4.1.2 Pflanzenmaterial

Als Pflanzenmaterial wurden die Mutante 46A, Trägerin des *lfa*-Allels, und deren Ausgangsform DGV mit dem *Lf*-Genotyp verwendet. Da sich Mutante und Ausgangsform -

abgesehen von möglicherweise vorhandenen stillen Mutationen - nur am *Lf*-Locus unterscheiden, sollten Expressionsunterschiede direkt oder indirekt mit dieser Mutation in Zusammenhang stehen. Weiterhin war Argument des Konzeptes, dass das vielfach beschriebene Auftreten von falsch positiven Kandidaten in der Differential Display Analyse (CALLARD et al., 1994; MIELE et al., 1998) durch die Auswahl, der hier verwendeten Pflanzen, auf ein Minimum reduziert werden könnte.

4.1.3 Differential Display-PCR

Zur Analyse differentieller Expression wurde in einem ersten Schritt die Differential Display-PCR eingesetzt (LIANG und PARDEE, 1992). Hierbei werden aus revers transkribierter Gesamt-RNA oder mRNA-Anreicherungen mittels einem am Poly-A-Schwanz der mRNAs bindenden Primer und Zufallsprimern DNA-Banden-Profile amplifiziert und zwischen verschiedenen Geweben verglichen. Unterschiede in diesen Profilen können dann auf unterschiedlich exprimierte mRNAs zurückgeführt werden. Diese Technik ist vielfach erfolgreich angewendet worden, so auch bei der Erbse (WOO et al., 1995; MARTIN-LAURENT et al., 1997).

Vorteile dieser Methode sind eine relativ einfache Durchführung, die uneingeschränkte Anwendbarkeit und das direkte Fokussieren auf die Ebene der Transkription.

Unter den im Zusammenhang mit Differential Display stehenden Publikationen findet man jedoch eine große Anzahl, die sich mit Problemen der Differential Display-PCR auseinandersetzen. Darunter werden vor allem die schlechte Qualität, die mangelhafte Reproduzierbarkeit, die Probleme zu komplexer Gele (MALHOTRA et al., 1998), die große Anzahl falsch positiv gewerteter Banden aufgrund instabiler PCR-Amplifikate (CALLARD et al., 1994; MIELE et al., 1998) sowie oft ein sehr starker Hintergrund, welcher amplifizierte Banden maskiert (ROUX et al., 1998), angeführt.

Es werden eine ganze Reihe unterschiedlichster Verbesserungsvorschläge der Methode präsentiert. Darunter finden sich zum Beispiel eine Optimierung der PCR durch Änderung des Temperatur-Profiles, der Zyklenanzahl oder Untergliederung der PCR in eine Preamplifikation und eine Haupt-PCR mit zwischengeschaltetem Verdünnungsschritt (GUIMARAES et al., 1995; ROUX et al., 1998), die Optimierung der Primerbindung durch spezielles Primerdesign (BAUER et al., 1993; LIANG et al., 1993; LIANG und PARDEE, 1995; LINSKENS et al.,

1995; GRAF et al., 1997), verbesserte Primer-Bindungstemperatur (MALHOTRA et al., 1998) und schließlich der Einsatz verschiedener Nukleinsäure-Hybridisierungstechniken zum Aufdecken falsch positiver Signale (CALLARD et al., 1994; MIELE et al., 1998).

Dies hat auf der einen Seite zu einer Vielzahl verschiedenster “optimierter“ Varianten der ursprünglichen Methode geführt, auf der anderen Seite aber zu einer Unübersichtlichkeit, die es schwierig macht, darunter wirklich qualitativ verbesserte Ansätze auszuwählen. Die stetigen Veröffentlichungen über Probleme und Verbesserungen des Differential Display sind aber auch ein Anzeichen dafür, dass die auftretenden Probleme eher in dem zugrunde liegenden Prinzip der Methode, nämlich dem Einsatz von Zufalls-Primern und den nicht stringenten PCR-Bedingungen zu suchen sind und sich auch durch die verschiedenartigsten Abwandlungen nicht vollständig überwinden lassen.

So wurden ganz ähnliche Probleme auch schon von der Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)-Methode berichtet (SKROCH und NIENHUIS, 1995), die für die Gewinnung molekularer Marker verwendet wird, und die mit ihrem Einsatz von Zufallsprimern und einer PCR unter nicht stringenten Bedingungen als Vorbild für die Entwicklung des Differential Display diente.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei unterschiedliche Varianten der Differential Display-PCR ausgewählt.

4.1.3.a Differential Display Reverse Transcribed PCR

Als erstes wurde die als DDRT-PCR veröffentlichte Methode verwendet. Diese Methode basiert auf dem ersten PCR-gestützten Protokoll zur Analyse differentieller Expression von LIANG und PARDEE (1992) in einer von BAUER et al. (1993) optimierten Variante. Die Auswahl der eingesetzten Zufallsprimer wird in dieser DDRT-PCR auf 26 Primer mit optimierten Bindungseigenschaften beschränkt.

Die Methode wurde für die Arbeit ausgewählt, da sie schon verschiedentlich in Kombination mit Silberfärbung der DNA publiziert worden war (LOHMANN et al., 1995; DOSS, 1996).

Die Qualität der Bandenprofile war jedoch nicht ausreichend für eine effiziente Analyse und Auswertung.

Als ein Vergleich in Bezug auf Qualität und Reproduzierbarkeit kann die im Zusammenhang mit dem *def*-Locus verwendete AFLP-Analyse genommen werden. Die AFLP-PCR mit

elektrophoretischer Auftrennung in einem Polyacrylamidgel und anschließender Silberfärbung führte zu guten Resultaten. Im Vergleich zum AFLP waren die Bandenprofile der DDRT-PCR sehr viel schwächer bei einem gleichzeitig stärkeren Hintergrund. Eine sichere Auswertung war so nur bei ca. 20 Banden pro Amplifikation und insgesamt bei ca. 6.200 Banden möglich. Es konnten dabei keine klaren Unterschiede festgestellt werden. Möglicherweise ergeben sich bei dem Vergleich starker Expressionsunterschiede trotzdem genügend Unterschiede, die eine Anwendung der Methode sinnvoll erscheinen lassen. Zur Detektion von nur geringen Expressionsunterschieden waren insgesamt zu wenig auswertbare Banden in der DDRT-PCR amplifiziert worden.

4.1.3.b Enhanced Differential Display

Es wurde eine weitere Variante der Differential Display-PCR, nämlich die Enhanced Differential Display-PCR (EDD) eingesetzt (LINSKENS et al., 1995). Die in dieser Methode verwendeten Primern entsprechen am 3'-Ende den Sequenzen der von Bauer et al. (1993) publizierten Methode. Am 5'-Ende sind sie jedoch um bis zu 12 zusätzliche Basenpaare verlängert worden, inklusive einer Restriktionserkennungssequenz für nachfolgende Klonierungen. In 4 vorgeschalteten PCR-Zyklen unter nicht stringenten Bedingungen erfolgt eine unspezifische Bindung nur der ursprünglichen Primer-3'-Region, wie in der Original-Methode. Dann schließen sich jedoch 22 Zyklen mit einer erhöhten und für den gesamten Primer spezifischen Bindungstemperatur an. Die Methode ist erfolgreich angewendet worden (OFIR et al., 1997) und führte auch in der vorliegenden Arbeit, wie schon von den Originalautoren beschrieben, zu einer deutlichen Verbesserung der Bandenprofile. So konnten pro Amplifikation ca. 45 und insgesamt ca. 11.000 Banden ausgewertet werden. Mit der EDD-Methode ist die Auswertung von ungefähr der doppelten Zahl an Banden wie bei der DDRT-PCR möglich. Trotzdem bleibt auch die Qualität der Bandenprofile der EDD-PCR weit hinter der der AFLP-Methode zurück.

Auch mit der EDD-Analyse konnten keine klaren Unterschiede in den Bandenprofilen festgestellt werden. Das Fehlen von Unterschieden sowohl in der DDRT-PCR als auch in der EDD-Analyse deutet darauf hin, dass zwischen den untersuchten Geweben nur geringe Expressionsunterschiede bestehen, oder aber dass die Methoden nicht geeignet sind, die vorliegenden Expressionsunterschiede zu detektieren.

Zu der Fähigkeit mittels Differential Display-PCR seltene mRNAs oder geringe Expressionsunterschiede zu detektieren gibt es gegensätzliche Veröffentlichungen. Während WAN et al. (1996) feststellen, dass mit der Differential Display-PCR mRNAs unabhängig von ihrer Häufigkeit detektiert werden, beobachten BERTIOLI et al. (1995) eine starke Verschiebung zugunsten von sehr häufigen mRNAs. Eine Verschiebung zugunsten häufiger mRNAs erscheint insofern plausibel, als seltene mRNAs, die in zum Teil weniger als 5 Kopien in einer Zelle vorliegen, nicht bis zu einer genügenden Häufigkeit in der PCR vervielfältigt und so durch den Hintergrund maskiert werden könnten.

4.1.4 Suppression Subtractive Hybridization

Um doch noch Expressionsunterschiede in den verglichenen Geweben detektieren zu können, wurde mit der SSH eine auf einem anderen Prinzip beruhende Methode verwendet (GURSKAYA et al. 1996; DIATCHENKO et al. 1996). Bei der subtraktiven Hybridisierung erfolgt eine Anreicherung differentiell exprimierter mRNAs durch eine Subtraktion der in beiden Geweben gleichzeitig vorhandenen mRNAs. In der SSH ist dieses Vorgehen mit einer PCR gekoppelt, die über den sogenannten PCR-Suppressions-Effekt (SIEBERT et al., 1995), nur solche Transkripte vervielfältigt, die parallel in zwei durchgeführten Subtraktionen übrig bleiben. Der Einsatz des PCR-Suppressions-Effektes führt zu einer zusätzlichen Anreicherung von differentiell exprimierten Transkripten und vor allem zu einer Normalisierung des Verhältnisses von häufigen zu seltenen Transkripten. Auf diese Weise wird für die SSH eine sehr hohe Empfindlichkeit postuliert, auch seltene Ziel-mRNAs detektieren zu können (GURSKAYA et al., 1996; VON STEIN et al., 1997). Die SSH ist in vielen Fällen erfolgreich angewendet worden, so auch bei der Erbse (SÄVENSTRAND et al., 2002).

4.1.4.a Überprüfung differentieller Expression der SSH-Klone

Die SSH-Analyse resultiert in einer SSH-cDNA-Bank, die die angereicherten EST-Klone enthält. Diese müssen dann einzeln in Dot-Blot Hybridisierungen, Northern Blots oder revers virtual Northern Blots auf ihre differentielle Expression in den verglichenen Ausgangsgeweben überprüft werden.

240 Klone der 1. Vorwärts-SSH und 194 Klone der 1. Reversen-SSH wurden in einem Differentiellen Dot-Blot-Screening überprüft. 40 Klone der Vorwärts- und 7 Klone der Reversen-SSH ergaben hierbei signifikante und reproduzierbare Unterschiede zwischen den SSH-Sonden. Es konnten jedoch keine Unterschiede bei der Hybridisierung mit den SMART-cDNA-Sonden festgestellt werden. Eine Erklärung hierfür wäre, dass die Klone von seltenen mRNAs stammen, die in der SMART-cDNA in zu geringer Kopienanzahl vorliegen, um ein Signal zu ergeben. Dafür spricht, dass keiner dieser Klone in der Hybridisierung mit den SMART-cDNA-Sonden zu einem starken Signal führte und das auch bei mehrfach durchgeführten Northern-Blot-Analysen (Ergebnisse nicht dokumentiert) keine Signale detektiert werden konnten. Dagegen spricht jedoch, dass die Klone, die im virtual-Northern Blot untersucht wurden, bei DGV und 46A ein gleichstarkes Signal ergaben.

96 Klone der 2. Vorwärts-SSH wurden in einem reversen virtual Northern Blot auf ihre differentielle Expression überprüft. Dabei konnten jedoch wiederum keine Unterschiede festgestellt werden.

Die grundsätzliche Effektivität der eingesetzten Methoden zur Überprüfung differentieller Expression konnte durch parallel im selben Labor im Rahmen anderer Arbeiten durchgeführte SSH-Analysen bei *Medicago truncatula* bestätigt werden (O. NYAMSUREN und F. KRAJINSKI, persönliche Mitteilung).

4.1.4.b Sequenzanalyse der SSH

47 Klone der 1. Vorwärts- und 1. Reversen-SSH, die im Dot-Blot-Screening eine differentielle Hybridisierung gezeigt hatten, wurden sequenziert.

59 Klone der 2. Vorwärts-SSH wurden sequenziert.

Für eine korrekte Einschätzung der NCBI-Datenbank-Analyse muss man sich einen Überblick über die dort zur Verfügung stehenden Sequenzdaten machen.

So sind von der in dieser Arbeit untersuchten Species *Pisum sativum* nur 200 ESTs, von nah Verwandten, wie *Medicago truncatula* über 170.000, Sojabohne über 280.000 und *Lotus japonicus* über 32.000 ESTs in der NCBI-Datenbank erfasst. Betrachtet man die gesamte Familie der Fabaceae, so entstammen allein 97 % ihrer in der Datenbank vorhandenen über 500.000 Nukleinsäure-Sequenzen von *Medicago truncatula*, *Glycine max* und *Lotus japonicus*. Dies erklärt, warum beim hier durchgeführten Datenbank-Screening fast ausschließlich ESTs dieser drei Arten und nur ein EST von der Erbse selbst erfasst wurde.

Es ist weiterhin wichtig, die Häufigkeitsverteilung, mit der ESTs den verschiedenen Geweben oder Organen der Pflanzen entstammen, mit in eine Bewertung der Ergebnisse ein zu beziehen. Da die meisten Untersuchungen an Leguminosen in Zusammenhang mit Stickstofffixierung und mykorrhizialer Symbiose erfolgen, entstammt auch ein Großteil der Datenbank-ESTs von Leguminosen aus Wurzelgewebe.

Exakte Daten für diese Tatsache wurden für *Medicago trunc.* errechnet, bei der über 54 % der ESTs aus Wurzelgewebe gewonnen wurden.

Die Wahrscheinlichkeit, Homologien zu ESTs aus Wurzelgewebe zu finden, ist damit generell erhöht, unabhängig davon, ob die zugrunde liegende mRNA, wie in der vorliegenden Arbeit, aus Spross- oder Blütengewebe stammt und auch dort vordringlich exprimiert wird. So hatten 25 % der ESTs Top-Treffer mit ESTs, die aus Wurzelgewebe stammten.

Bemerkenswert ist weiterhin, dass ganz im Gegensatz zu der geringen Anzahl an EST-Daten für die Erbse 1.900 Proteinsequenzen gegenüber nur knapp 200 bei *Medicago* vorhanden sind. Dies spiegelt die Schwerpunkte der Forschung an beiden Species wieder. Mit 97.000 Proteinen stellt *Arabidopsis thaliana* mit Abstand die meisten Proteinsequenzen in der Datenbank. Diese Verhältnisse spiegeln sich in den Treffern wieder, unter denen sich 32 mal *Arabidopsis*, 11 mal *Pisum sativum* jedoch keinmal *Medicago truncatula* findet. In der Tabelle 4.1 sind einige Species im Vergleich ihrer vorhandenen Sequenzdaten dargestellt. Die Gesamt-EST-Angaben entstammen dem "database EST - Summary by organism"/NCBI vom 27.09.2002. Die Zahlen der gewebespezifischen ESTs von *Medicago* wurden mit Hilfe von Daten des "Tissue, cDNA Library Name or cDNA Library Identifier" des TIGR-Medicago-Gene-Index⁴ berechnet (QUACKENBUSH et al., 2001). Die mit dem Stern* gekennzeichneten Werte geben die Anzahl

⁴Eine genaue Auflistung der Medicago-EST- und cDNA-Libraries kann unter folgenden Web-sites eingesehen werden: <http://www.tigr.org/docs/tigr-scripts/tgi/lib-type.pl?db=medicest> sowie http://www.tigr.org/webserver_tmp/libtc_tmp/medicest.lib

an Treffern wieder, welche man bei Eingabe der Kombination von z. B. EST & Flower in die NCBI/Entrez/nucleotide-Suchmaske erhält und entsprechen somit nicht der wirklichen Anzahl. Die Anzahl vorhandener Gesamt-Nukleinsäuren- und Gesamt-Protein-Sequenzen entstammen den Taxonomie-Daten des NCBI.

Tab. 4.1: Verschiedene Species im Vergleich ihrer verfügbaren Sequenzdaten in der NCBI-Datenbank. Mit * gekennzeichnete Zahlen stellen nicht die wirkliche Anzahl vorhandener Sequenzen da (siehe Text oben).

	<i>Pisum sat.</i>	<i>Medicago t.</i>	<i>Glycin max</i>	<i>Lotus jap.</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>Homo s.</i>
Gesamt-NS	1 450	174 600	296 200	32 400	413 000	> 6 Millionen
Gesamt-EST	200	170 500	284 000	32 000	177 000	4,7 Millionen
EST & Wurzel	12*	> 90 000	16 500*	8 350*	5 300*	-
EST & Spross	1*	2 800*	20 200*	-*	25*	-
EST & Blüte	1*	6 700*	1*	900*	10 500*	-
EST & Blatt	38*	22 900*	20 500*	-*	5 000*	-
Gesamt-Protein	1 900	193	2 150	320	97 000	175 000

Unter den sequenzierten Klonen finden sich eine auffällig große Anzahl an DNA-bindenden Proteinen und regulatorischen Proteinen. So waren mehr als 50 % der homologen Proteine mit bekannter Funktion regulatorische Proteine. Es wurden unter anderem ein putatives Zinkfinger-Protein, eine Rezeptor-ähnliche Kinase, drei Myb-ähnliche Proteine mit DNA-Bindungs-Domänen, ein Auxin-bindender Transkriptionsfaktor, ein TATA-Bindungs-Protein assoziierter Faktor, ein Splicing-Faktor, zwei verschiedene Zykline (regulatorische Proteine des Zellzyklus), ein regulatorisch adressierendes Ubiquitin-anbindendes Protein, zwei verschiedene GTP-bindende regulatorische Proteine, ein Kern-Import-Protein, und ein Spross-Meristem-formierendes Protein detektiert. Keines dieser Gene konnte jedoch eindeutig der Blüte zugeordnet werden, obwohl eine Anzahl dieser Genfamilien in Blühvorgänge involvierte Mitglieder besitzt.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Sequenzanalyse der ausgewählten ESTs der 1. und 2. SSH bestätigt in gewissem Sinne die Ergebnisse der verschiedenen Hybridisierungen (Dot-Blot-Screening, virtual-Northern-Blot) zur Detektion differentieller Expression. So wie in diesen Analysen ergab sich auch durch die Sequenzanalyse kein direkter Hinweis auf eine signifikante und spezifische Anreicherung der Vorwärts-SSH-Banken für im Zusammenhang

mit der Blüte stehende Transkripte. Zwar stammten 16 von 49 homologen ESTs aus cDNA-Banken, die aus reproduktivem Gewebe, wie Blüten und Früchten gewonnen worden waren. Jedoch konnte in der gesamten Sequenzanalyse auf homologe Proteine mit der Phytoene Synthese nur eine Homologie zu einem Protein detektiert werden, welches, durch verschiedene Publikationen belegt, während der Blüte verstärkt exprimiert wird (GIULIANO et al., 1993; ZHU et al., 2002).

4.1.5 Zusammenfassende Beurteilung der Ergebnisse der Analyse differentieller Expression

In der SSH-Analyse konnten keine signifikanten differentiell exprimierten Klone detektiert werden. Dieses Ergebnis wird durch die unabhängige Wiederholung der Vorwärts-SSH, und durch die Ergebnisse der DDRT-Analyse und der EDD-Analyse bestätigt. Auch in diesen vorangegangenen Analysen konnten keine Unterschiede in der Expression zwischen den untersuchten Geweben festgestellt werden konnten.

Das Ergebnis ist in sofern unerwartet, als die verglichenen Spross-Apices sich durch eindeutig in der Ausbildung befindliche Blühmeristeme bei der Mutante von dem eindeutig vegetativen Zustand des Wildtyps unterschieden. Die Initiation der Blüte mit vielfältigsten phänotypischen Unterschieden, darunter der Anlage eigenständiger Organe im Vergleich zum vegetativen Zustand, schien eine geeignete Voraussetzung für differentielle Expressionsanalysen. Die SSH ist auch schon erfolgreich verwendet worden, um cDNAs zu detektieren, die in Blüten induziert werden (KIM et al., 1999).

Es gibt zwei plausible Erklärungsmöglichkeiten für das in den unabhängig durchgeführten Experimenten festgestellte Fehlen von detektierbaren Expressionsunterschieden:

1. Die eingesetzten Methoden sind nicht empfindlich genug, um die vorhandenen Unterschiede aufspüren zu können.
2. Die für den Vergleich ausgewählten Gewebe unterscheiden sich zum Zeitpunkt der RNA-Extraktion nicht genügend in ihren Expressionsmustern.

Die grundsätzliche Effektivität der SSH-Methode in der Detektion von Expressionsunterschieden konnte durch im Institut parallel und zum Teil auch von mir selber durchgeführte Analysen bestätigt werden. So waren bei *Medicago truncatula* zwischen mit

symbiontischen Pilzen mykorrhizierten, mit Oomyceten infizierten Pflanzen und Kontrollpflanzen eindeutige Unterschiede festzustellen, und dies sowohl auf der Ebene der virtuellen Northern-Hybridisierung als auch auf der Ebene der Sequenzanalyse. EST-Homologie-Vergleiche zeigten, dass eine große Anzahl an mit Stress-Antwort, Pathogen-Antwort und Mykorrhiza zusammenhängenden Genen durch die SSH angereichert werden konnten (O. NYAMSUREN und F. KRAJINSKI, persönliche Mitteilung). Trotzdem lässt sich daraus keine generelle Aussage über die Sensitivität der SSH treffen, da es sich bei der Pathogen- oder Stressantwort zumeist um qualitative Unterschiede von häufigen mRNAs (high copy-mRNA) handelt.

Zu der Empfindlichkeit der SSH und ihrer Eignung, auch seltenste mRNAs bei differentieller Expression aufspüren zu können, gibt es jedoch keine eindeutigen Untersuchungen. Ein ernsthaftes Problem bei subtraktiven Hybridisierungen von cDNAs scheint jedoch die Ausbildung von heterologen Doppelstranghybriden im Bereich des Poly-A/Poly-T-3'-Endes der cDNAs zu sein, die zu einer allgemeinen unspezifischen Subtraktion führt. Dies kann vor allem in der Entfernung von Transkripten resultieren, die in nur wenigen Kopien vorliegen (WANG, 2000).

Gerade diese seltenen mRNAs codieren aber oft für regulatorische Proteine mit Schlüsselfunktionen bei der Differenzierung, dem Entwicklungsablauf oder der Regulation des Zellwachstums (MARTIN und PARDEE, 2000). Die Erkenntnisse über die Blüteninitiation bei *Arabidopsis* und die damit in Zusammenhang stehenden klonierten Gene sprechen dafür, dass regulatorische Proteine eine herausragende Rolle auch bei der Initiation der Blütenmeristeme einnehmen (LEVY und DEAN, 1998). So codieren die beiden entscheidenden Blüh-Meristem-Identitäts-Gene von *Arabidopsis* *LEAFY* für ein homeotisches und *APETALA1* für ein MADS-Box Gen, beides Gen-Klassen mit DNA-Bindungs-Domäne.

Eine mögliche Erklärung dafür, dass in der vorliegenden Arbeit keine eindeutigen blühspezifischen Transkripte detektiert wurden, liegt also in der Annahme, dass die Initiation der Blüte über eine differentielle Expression vor allem von regulatorischen Proteinen zusammen mit einer feinen Modulation der Expression einer Anzahl von häufigen Genen erfolgt. Dafür spricht auch, dass in dem eingesetzten Apex-Gewebe die lateral angelegten Blütenknospen zwar als eindeutig unabhängige Organe vom SAM zu unterscheiden sind, dass aber ihr Initial-Gewebe sich in seinem Entwicklungs- und Differenzierungs-Stadium nicht wesentlich von dem des SAM unterscheidet. Das Gewebe besteht in beiden Fällen aus relativ undifferenzierten

chloroplastenhaltigen Zellen.

Möglicherweise laufen die ersten Schritte der Blüteninitiation, die neben dem Spross-Apikal-Meristem (SAM) zur Anlage der Blühmeristeme und der sich daraus entwickelnden Blütenknospen führen, ohne starke Expressionsunterschiede von häufigen Transkripten ab. Die Sensitivität der Methoden zur Detektion differentieller Analysen könnte zu gering sein, um Expressionsunterschiede hier involvierter seltener Transkripte zu erfassen.

Als letzter Punkt soll noch auf die durch neuere Erkenntnisse gewachsene Bedeutung posttranslatonaler Modifikationen hingewiesen werden (VAN WIJK, 2001; RAPPSILBER und MANN, 2002). Es ist nicht auszuschließen, dass solche Modifikationen von Peptiden durch z. B. Glykosylierungen, proteolytische Prozessierung oder terminale Modifikationen Funktionen bei der Blüteninitiation übernehmen.

4.1.6 Ausblick für den *Late Flowering-Locus*

In der vorliegenden Arbeit konnte festgestellt werden, dass eine Detektion von mit der Blüteninitiation in Zusammenhang stehenden Genen über eine differentielle Expressionsanalyse in der beschriebenen Weise nicht möglich ist. Für eine weitergehend Analyse der Blüteninitiation der Erbse unter Fokussierung auf den *Lf*-Locus muss deswegen eine alternative Strategie entwickelt werden.

Hierbei sollte die stetig steigende Zahl an klonierten Blüh-Genen bei *Arabidopsis thaliana* für ein weiteres Vorgehen berücksichtigt werden. So wurden mittlerweile auch eine Anzahl an Genen kloniert, die aufgrund ihrer Funktion als orthologe Gene des *Lf*-Gens in Frage kommen. Darunter sind das *Embryonic Flower-Gen 1* (*EMF1*, AUBERT et al., 2001), dem lange Zeit die Funktion des zentralen Blührepressors zugesprochen wurde (z. B. KOORNNEEF et al., 1998; SIMPSON et al., 1999), das *Terminal Flower Gen 1* (*TFL1*, SHANNON und MEEKS-WAGNER, 1991), das *FRIGIDA-Gen* (*FRI*, JOHANSON et al., 2000). Aufgrund neuerer Untersuchungen besonders hervorzuheben ist der *Flowering Locus C* (*FLC*, *FLF*, SHELDON et al., 1999; MICHAELS und AMASINO, 1999). Schließlich wurden jüngst mit dem *VERNALIZATION INDEPENDENCE 4-Locus* (ZHANG und VAN NOCKER, 2002) und dem *MADS Affecting Flowering 1* (RATCLIFFE et al., 2001) weitere bis dahin völlig unbekannte Gene bei *Arabidopsis* beschrieben und kloniert, die bei einer Bestätigung ihrer Funktion auch

als mögliche Kandidaten für ein Ortholog des *Lf*-Gens in Frage kommt.

Das *EMFI*-Gen ist mit über 4000 codierenden bp ein relativ großes Gen. Eine mögliche Erklärung der extremen Anfälligkeit für spontane Mutationen des *Lf*-Gens könnte auf diese außergewöhnliche Größe der codierenden DNA-Sequenz zurück zu führen sein. In der Konsequenz wäre die Größe ein Indiz dafür, dass es sich bei dem *EMFI*-Gen möglicherweise um das *Arabidopsis*-Ortholog des *Lf*-Gens bei der Erbse handelt.

Jüngste Northern-Analysen und Suppressionsstudien durch Antisense-RNA der *EMFI*-Expression widerlegen jedoch die ursprünglich angenommene zentrale Blüh-Repressorfunktion des Gens (Aubert et al., 2001). Es wird ubiquitär exprimiert und hat starke pleiotrope Effekte. Die zentrale Funktion des *EMFI*-Locus als Repressor wird deswegen heute verworfen (SIMPSON und DEAN, 2002). Damit ist aber auch seine Kandidaten-Stellung als Ortholog zum *Lf*-Gen fraglich.

Das *TFLI*-Gen konnte mittlerweile durch den Einsatz degenerierter Primer dem *determinate*-Locus (*det*) der Erbse als Ortholog zugeordnet werden (FOUCHER et al., 2002).

Die Funktion des *FRIGIDA*-Gens als ein nur mit dem Vernalisationsprozess interagierenden Blührepressor (JOHANSON et al., 2000; SIMPSON und DEAN, 2002) macht eine Verbindung zum *Lf*-Locus eher unwahrscheinlich.

Dem *FLC*-Locus wird heute die zentrale Repressor-Funktion in der autonomen und der Vernalisations-Steuerung der Blüteninitiation zugesprochen (BLAZQUEZ et al., 2001). Die nach seiner Klonierung untersuchte Funktion und Expression (SHELDON et al., 1999, MICHAELS und AMASINO, 1999) entspricht auffällig der Funktion des *Lf*-Gens der Erbse und dessen angenommener lokaler und zeitlicher Expression (Abb 4.1).

Es erscheint aufgrund dieser Ähnlichkeit sinnvoll, als neues Konzept die Isolierung eines möglichen Orthologs des *FLC*-Gens in der Erbse anzunehmen. Die erfolgreiche Durchführung eines solchen Ansatzes wurde für das *TFLI*-Gen beschrieben. Auch für andere Blühgene von *Arabidopsis* wurden orthologe Sequenzen in der Erbse isoliert, die jedoch noch keinem bekannten Blühgen der Erbse zugeordnet werden konnten (F. FOUCHER, persönliche Mitteilung). Als methodischer Ansatz zur Isolierung orthologer Gene empfiehlt sich hierzu die "Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers"(CODEHOP)-Strategie (ROSE et al., 1998; MORANT et al., 2002). Sie verbindet die Strategie, einen Mix degenerierter Primer

einzusetzen, mit der Strategie, nur einen auf einer Konsensus-Region basierenden Primer zu verwenden.

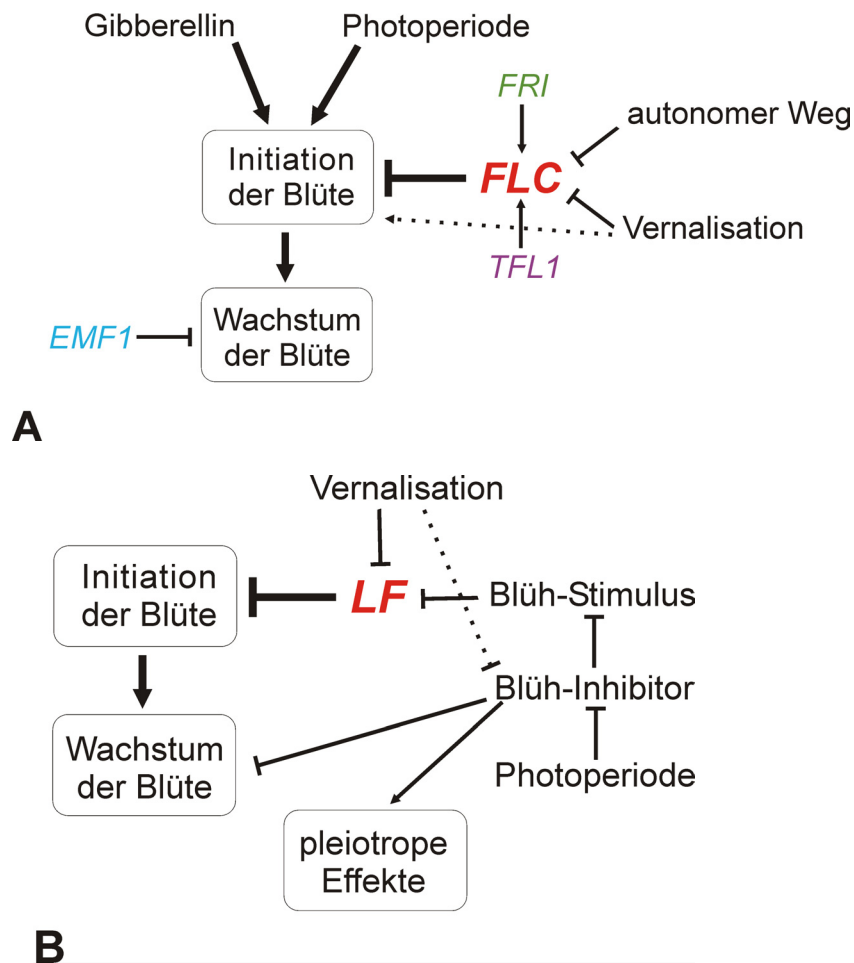


Abb 4.1: Modelle für die Blüteninitiation

A Modell für *Arabidopsis thaliana* angelegt an SIMPSON et al., 1999; MICHAELS und AMASINO, 1999; SIMSON und DEAN, 2002. Die Initiation der Blüte erfolgt über die Integration der verschiedenen Blühsignal-Wege durch sog. "Floral Pathway Integrator Genes". Das Wachstum der Blüte wird kontrolliert durch die sog. "Floral Meristem Identity Genes". Zentraler Blührepressor bei *Arabidopsis* ist das *FLC*-Gen.

B Modell für die Erbse angelegt an WELLER et al., 1997. Das Verhältnis von Blüh-Stimulus zu Inhibitor muss über ein durch den *LF*-Locus festgelegtes Niveau steigen, um die Blüte zu initiieren. Der Blüh-Inhibitor hat pleiotrope Effekte. Zentraler Blührepressor bei der Erbse ist das *LF*-Gen.

4.2 Kartierung des *def*-Locus

Die Verringerung von Ernteverlusten durch ein vorzeitiges Ausstreuen der Samen ist ein wesentliches Ziel in der Pflanzenzüchtung.

Unter diesem Gesichtspunkt sind vor allem äußere Faktoren und agronomische Parameter untersucht worden, die einen Einfluss auf die Abscissionszonen der Früchte haben (GARCIA-DIAZ und STEINER, 2000; MORGAN et al., 2000). Darüberhinaus sind eine Vielzahl an Erkenntnissen über die genaue Anatomie und Ultrastruktur der Zellabtrennungszonen (VAN DOORN und STEAD, 1997), Hormone (PATTERSON, 2001) und Enzyme (BONGHI et al., 2000), die im allgemeinen die Abscission beeinflussen, gewonnen worden.

Das Besondere des *def*-Locus ist demgegenüber jedoch dessen präziser Effekt nur auf die Hilum-Abscissionszone, ohne andere Abscissionszonen oder andere Eigenschaften zu beeinflussen. Um molekulare Mechanismen und biochemische Reaktionsketten genau aufklären zu können, sind Erkenntnisse über solche spezifisch wirkenden Gene, ihre Regulation und ihre präzise arbeitenden Promotoren notwendig, die das Wissen der vielschichtigeren Effekte von Hormonen und Enzymen ergänzen und auf einen Aktionsbereich beschränken können.

Daneben können solch präzise wirkenden Gene beim Einsatz in transgenen Pflanzen erwünschte Effekte ohne unvorteilhafte pleiotrope Wirkungen auslösen.

4.2.1 Amplified Fragment Length-Polymorphism-Analyse

Es gibt eine Vielzahl an verschiedenen Methoden, um molekulare Marker zu gewinnen. Die meisten dieser Methoden erfolgen mit Hilfe der PCR.

Man kann die "klassischen" PCR-gestützten Marker in zwei Gruppen unterteilen:

Die erste Gruppe basiert auf zuvor gewonnenen DNA-Sequenzinformationen, die dann für spezifische PCRs genutzt werden. Zumeist werden hier Einzelloci dargestellt, deren polymorphes Verhalten zwischen verschiedenen Individuen vorher festgestellt werden konnte. Die bekanntesten und meist verwendeten darunter sind die Microsatelliten oder "Simple Sequence Repeats" ("SSR", TAUTZ, 1989), die "Cleaved Amplified Polymorphic Sequences" (CAPS", KONIECZNY und AUSUBEL, 1993) und die "Sequence Characterized Amplified Regions" oder "Sequence Tagged Sites"("SCAR", "STS", PARAN und MICHELMORE,

1992). Es handelt sich bei dieser ersten Gruppe durchweg um stabile und reproduzierbare Marker, deren Entwicklung aber eines nicht unerheblichen Zeit- und Kostenaufwandes bedarf.

Die zweite Gruppe benötigt keine ausführlichen Sequenzinformationen, sondern nutzt die Tatsache, dass kurze Ziel-Sequenzen wie Restriktionsschnittstellen mit voraussagbaren Häufigkeiten über ein Genom verteilt sind. Die bekanntesten Vertreter dieser Markergruppe sind die "Random Amplified Polymorphic DNA" ("RAPD" WILLIAMS et al., 1990), das "DNA Amplification Fingerprinting" ("DAF", CAETANO-ANOLLES et al., 1991) und die in dieser Arbeit verwendete AFLP-Methode. Diese Methoden ermöglichen es, ohne Vorinformationen eine theoretisch unbegrenzte Anzahl an Loci zu amplifizieren. Je nach dem Grad der DNA-Polymorphie, welcher zwischen den untersuchten Genomen besteht, wird ein bestimmter Prozentsatz der untersuchten Loci polymorph sein und kann dann bei geeigneter Kopplung als informativer Marker genutzt werden.

Neben diesen zwei Gruppen stellen die "Single Nucleotide Polymorphisms" ("SNPs", LANDEGREN et al., 1998) eine neue und eigene Klasse von molekularen Markern dar, deren Entwicklung eng mit der explosionsartigen Zunahme an verfügbaren Sequenzdaten zusammenhängt. Die Einzelnukleotid-Polymorphismen werden mit einer Vielzahl unterschiedlicher Methoden detektiert und dargestellt. SNP-Analysen findet jedoch vor allem bei solchen Species Anwendung, für die eine besonders große Zahl an Sequenzdaten verfügbar ist, so z. B. beim Menschen und innerhalb der Pflanzen vor allem bei *Arabidopsis thaliana*.

Für die vorliegende Arbeit wurde die AFLP-Methode aus verschiedenen Gründen ausgewählt:

1. Es gibt für die Erbse keine ausreichende Zahl an zugänglichen Sequenzdaten, um daraus SSRs, CAPS oder auch SNPs in genügend großer Anzahl ohne entsprechenden Aufwand gewinnen zu können. Auch kann die Erstellung von diesen spezifischen Einzelloci nicht auf eine bestimmte genetische Region begrenzt werden.
2. Mit der AFLP-Methode lassen sich mit großem Abstand die meisten Loci pro Reaktion amplifizieren und analysieren. In der vorliegenden Arbeit konnten im Durchschnitt 60 Banden pro Primerkombination analysiert werden, während mit der DAF-Methode bei der Erbse

durchschnittlich 18 (CAETANO-ANOLLES et al., 1993) und mit der RAPD-Methode durchschnittlich nur 4 Banden (VON STACKELBERG, 1996) in die Analyse eingehen können.

3. Die AFLP-Methode zeichnet sich durch eine sehr gute Reproduzierbarkeit aus. Die Problematik einer durch die kurzen Zufallsprimer unspezifischen PCR und der daraus resultierenden schlechten Reproduzierbarkeit, die vor allem der RAPD-Methode anhaftet (ELLSWORTH et al., 1993; SKROCH und NIENHUIS, 1995; KHANDKA et al., 1997), konnte mit der Entwicklung der AFLP-Methode überwunden werden. Durch die Ligation von Adaptersequenzen an restringierte genomische DNA wird diese mit adapterspezifischen Primern unter stringenten PCR-Bedingungen amplifiziert. Auch in dieser Arbeit waren die AFLP-Bandenmuster konstant zu reproduzieren.

4. Die AFLP-Methode lässt sich mit einer Bulk Segregant Analyse kombinieren. Dadurch ist eine Fokussierung der detektierbaren Polymorphismen auf die Region um den interessierenden Genort möglich.

Die Produkte der AFLP-PCRs entsprachen in etwa den in der Literatur für die Kombination mit der Erbse beschriebenen Resultaten (CHALHOUB et al., 1997; TIWARI et al., 1999; COYNE et al, 2000).

Die Größe der in den AFLP-Analysen amplifizierten Banden lag zwischen 60 und 1000 bp. Banden, die kleiner als 100 bp waren, waren aufgrund schwacher Anfärbung und unscharfer Abgrenzung zumeist nicht optimal auszuwerten. Deswegen ging nur ein Marker mit weniger als 100 bp in die Analyse ein. Banden, welche größer als 600 bp waren, konnten durch eine Verlängerung der Laufzeit der Elektrophorese bedeutend besser aufgelöst werden. Die Reproduzierbarkeit der Amplifikate über 600 bp war jedoch etwas verringert. Dies führte im Verlauf der Analysen zum Ausschluss einiger größerer Marker. Andererseits sind größere AFLP-Marker für die Konvertierung in sequenzspezifische Marker besonders geeignet.

4.2.2 Silberfärbung

In den meisten Publikationen werden die AFLP-Amplifikate entweder mit Radioaktivität oder Fluoreszenz visualisiert. Zur radioaktiven Markierung wird der *EcoR* I-Primer vor der PCR am 5'-Ende mit γ -³²P- oder γ -³³P-ATP phosphoryliert. Die radioaktiv markierten DNA-Stränge werden nach der PCR und der Gelelektrophorese zur Belichtung von Röntgenfilmen eingesetzt. Für die Fluoreszenzmarkierung wird ein fluoreszierender Farbstoff an ein Nukleotid gebunden und in der Primersynthese inkorporiert oder am 3'-Ende angehängt. Die Detektion erfolgt hier in automatischen Sequenziergeräten über Fluoreszenzmessung.

In der vorliegenden Arbeit wurde die AFLP-Methode jedoch mit einer Silberanfärbung der DNA im Polyacrylamidgel nach BASSAM et al. (1991) kombiniert.

Diese Kombination ist schon für die Erbse beschrieben worden (CHALHOUB et al., 1997; TIWARI, 1999; COYNE, 2000) und auch für andere Species (ZHANG und STOMMEL, 2000; MANO et al. 2001). Sie wird jedoch weder von den Originalautoren noch von den Lizenznehmern (Keygene, Invitrogen-GIBCO) vorgeschlagen, obwohl sie gerade für kleinere Labors ohne die Möglichkeiten eines Sequenzierautomaten oder die Nutzung von Radioaktivität eine sehr geeignete Alternative darstellt.

Im Vergleich zur radioaktiven Markierung hat die Silberfärbung den Vorteil einer sehr viel kürzeren Durchführungszeit und der Vermeidung schädlicher Strahlung. Im direkten Vergleich der Silberfärbung mit der Fluoreszenzmarkierung konnte darüberhinaus eine größere Anzahl an detektierbaren Banden bei der Silberanfärbung festgestellt werden (COYNE, 2000). Ein weiterer großer Vorteil gegenüber sowohl der Fluoreszenz- als auch der Radioaktivitäts-Markierung ist die direkte Anfärbung der DNA im Gel. AFLP-Banden können so eindeutig identifiziert und für eine Klonierung aus dem Gel ausgeschnitten werden.

Die Problematik der Anfärbung von Doppelbanden der in Einzelstränge denaturierten DNA-Fragmente erwies sich als unerheblich.

Interessanterweise konnte der Zusatz an denaturierendem Probenpuffer zu den PCR-Proben von der Hälfte auf ein Fünftel reduziert werden, ohne das sich das Lauf- und Auftrennungsverhalten der Banden änderte. Die Summe der anderen eine DNA-Denaturierung bewirkenden Parameter, nämlich 7,5 molarer Harnstoff im Gel, Erwärmung des Gels durch den elektrischen Widerstand auf ca 45 - 55 °C und Erhitzung der DNA vor dem Auftrag auf das Gel für 5 Minuten bei 99 °C, scheinen den Zusatz an denaturierendem Probenpuffer überflüssig zu machen. Einzig eine

ausreichende Erhöhung der Dichte der aufzutragenden Probe muss gesichert sein, damit diese effektiv in die Auftragstasche des Gels sinkt.

Bei der 5 minütigen Denaturierung bei 99 °C wurden die PCR-Proben ohne Deckel in den Thermoblock gestellt. Dadurch erfolgte eine Konzentration der Proben auf etwa 2/3 des Ausgangsvolumens durch Verdunstung.

Hierdurch und durch die Reduzierung des Probenpuffers kann der Anteil an PCR-Produkt, welcher auf das Gel geladen wird, deutlich erhöht werden.

Eine weitere bemerkenswerte Beobachtung ist, dass die Silberfärbung in 4 %igen Gelen aus einem Gemisch von 29 % Acryl : 1 % Bisacryl eine signifikant bessere Qualität (geringerer Hintergrund) als in den verbreitet eingesetzten 5 - 7 %igen Gelen mit einer Mischung von 19 % Acryl : 1 % Bisacryl erreicht.

4.2.3 Pflanzenmaterial

Als Pflanzenmaterial wurde eine Kreuzungs-Population von DGV und PF eingesetzt. Die PF, eine Zuchtlinie der Saatgutirma Pjabjergfonden, entstammt einer Kreuzung einer russischen Linie "Cisia" mit der Linie "BODIL" und ist Träger der Mutation des *def*-Locus. DGV ist eine traditionelle deutsche Sorte. Somit war bei den Kreuzungspartnern von einem geeigneten Grad an genetischer Distanz und damit DNA-Polymorphismen auszugehen. Der durchschnittliche AFLP-Polymorphiegrad von 13 % bestätigte diese Annahme. Je höher dieser Wert ist, desto mehr informative Loci kann man auch in der Nähe des zu kartierenden Gens detektieren. In vergleichbaren durchgeführten Kartierungsexperimenten war ein Polymorphiegrad von 7 % ausreichend für eine genügende Markersättigung um den interessierenden Genort (SIMMONS et al. 1997; LAHAYE et al., 1998). Durch gezielte Auswahl der Kreuzungspartner konnten jedoch auch bis zu 50 % detektierbare DNA-Polymorphie erreicht werden (THOMAS et al., 1995). Bei der Erbse sind solche hohen Werte nicht zu erreichen, da sie als autogame Pflanze eine geringere Variabilität im Genpool besitzt.

4.2.4 Bulked-Segregant-Analyse

Die AFLP-Analyse wurde mit der Bulked-Segregant-Analyse (BSA, MICHELMORE et al., 1991) verbunden. Diese Methode ist einer der am häufigsten verwendeten Ansätze, um bei Kartierungen genetischer Loci auf eine den interessierenden Locus möglichst eng eingrenzende Region fokussieren zu können (z. B. REAMON-BÜTTNER et al., 1998; SCHWARZ et al. 1999; AGRAMA et al. 2002).

Die hier verwendeten Bulks enthielten die DNA von je 10 F₂-Pflanzen mit entweder homozygot dominant oder homozygot rezessivem *def*-Genotyp. Dies führt dazu, dass polymorphe DNA und damit auch auffindbare Marker-Loci zwischen den Bulks nur in einem den Genort umgebenden sog. genetischen Fenster vorhanden sind. Es wurden nicht mehr als 10 Pflanzen pro Bulk verwendet, um die Nachweisgrenze eines einzigen Allels durch die PCR nicht zu unterschreiten (WILLIAMS et al., 1993). Dem liegt die Überlegung zu Grunde, dass, wenn von den 20 möglichen Allelen (bei 10 diploiden Pflanzen im Bulk) nur eins zu einem PCR-Produkt führt, dies trotzdem noch detektiert werden kann.

Um eine ausreichende Sicherheit zu haben, dass gefundene polymorphe AFLP-Banden mit dem Genort gekoppelt sind, wurden je zwei Dominanten-Bulks mit zwei Rezessiven-Bulks verglichen. Dadurch gingen mit insgesamt 40 hinreichend viele F₂-Pflanzen in die BSA ein, um eine Kopplung gefundener Marker mit dem *def*-Locus zu gewährleisten.

In der Arbeit wurden mit der AFLP-Analyse von 64 unterschiedlichen Primerkombinationen in der BSA 44 polymorphe Banden zwischen den dominanten und rezessiven Bulks für eine weitere Analyse ausgewählt. Das entspricht einer Positionierung von ca. jedem 14ten Polymorphismus in dem durch die BSA offen gelassenen "genetischen Fenster".

Dies stimmt sehr gut mit den Erwartungswerten überein, welche sich aus den Daten der Konsensus Kopplungskarte für *Pisum sativum* (WEEDEN et al., 1998) ableiten lassen:

Die Konsensus Karte hat eine Länge von insgesamt 800 cM, wobei jede der 7 Kopplungsgruppen, und damit jedes der 7 Chromosomen, sich über ca. 100 cM erstreckt. Sind nun mit der AFLP-Methode detektierbare DNA-Polymorphismen zufällig über das Genom verteilt, so würde im Durchschnitt jeder 7te auf dem gewünschten Chromosom liegen und, wie tatsächlich beobachtet, jeder 14te in einem Bereich von ca. 50 cM um das interessierende Gen.

Durch die Ermittlung der Entfernungen der AFLP-Loci zum *def*-Genort und die Karte aus der Multipunkt-Analyse (siehe 3.2.11 und 3.2.12) lässt sich eine Aussage über die Größe des “genetischen Fensters” der BSA machen. Dies genetische Fenster definiert den Bereich um den *def*-Genort, innerhalb dessen DNA-Polymorphismen zwischen den Bulks zu finden sind. Kein Marker ist nach der Zweipunkt-Analyse weiter als 20 cM vom Genort entfernt und die Größe der mit Hilfe von MAPMAKER berechneten Karten beträgt 31 cM bzw. 36 cM. Somit kann angenommen werden, dass das “genetische Fenster” nicht größer als 40 cM ist.

4.2.5 F2-Einzelpflanzen-Analyse

Die Aufspaltung der AFLP-Marker, die in der BSA ausgewählt worden waren, wurde anschließend in bis zu 207 Pflanzen der F2 untersucht. Das primäre Interesse lag bei diesen Analysen darin, Marker mit möglichst enger Kopplung zum *def*-Gen zu finden. Aus diesem Grund waren für diese Aufspaltungsanalyse die für das *def*-Gen homozygot dominanten und homozygot rezessiven F2-Pflanzen der gesamten F2-Population ausgewählt worden. Diese homozygoten F2-Pflanzen ergeben den größtmöglichen Informationsgehalt über Rekombination oder Kopplung zwischen AFLP-Markern und dem interessierenden Locus. In der Summe wurde die Rekombination oder Kopplung der AFLP-Marker zum *def*-Gen in mehr als 5600 Fällen festgestellt und in die Zweipunkt- und Multipunktanalyse mit einbezogen. Von 44 in der BSA ausgewählten AFLP-Marker waren 6 Marker problematisch auszuwerten. Die entsprechenden Banden erwiesen sich als entweder nicht stabil amplifizierbar oder sie waren nicht exakt von Nebenbanden zu unterscheiden, wodurch das Risiko für Falschbewertungen zu groß wurde. Sie wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

Die AFLP-Marker zeigten in einigen Pflanzen häufiger Rekombinationen zu dem *def*-Gen. Dies ist durch die unterschiedlichen Positionen der Crossover-Ereignisse in den verschiedenen F2-Pflanzen zu erklären. Je näher diese Kopplungsbrüche an dem interessierenden Genort liegen, desto mehr der untersuchten AFLP-Marker liegen distal dazu und sind somit rekombiniert. Ausnahme sind Marker, die durch eine gerade Anzahl von Mehrfach-Crossovers keine Rekombination zeigen. Dies war jedoch bei den untersuchten Markern nicht der Fall, wahrscheinlich weil sie alle zu eng gekoppelt vorliegen und die Wahrscheinlichkeit eines Doppel-Crossovers zwischen ihnen und dem *def*-Gen sehr gering ist. Setzt man darüberhinaus eine positive Interferenz für distale Chromosomenbereiche voraus (ESCH und WEBER, 2002)

verringert sich die Chance eines Doppelse-Crossovers zusätzlich.

Die F₂-Pflanze 148 zeigte für alle, die Pflanze 98 immerhin für 21 der 38 untersuchten Marker eine Rekombination zum *def*-Locus. Diese Pflanzen scheinen somit, die zum *def*-Gen am nächstgelegenen Kopplungsbrüche zu besitzen.

4.2.6 Kombinierte Bulk- und Einzelpflanzen-Analyse

Um AFLP-Marker zu finden, die in der F₂-Population mit dem *def*-Gen ko-segregieren, wurden mit neuen Primerkombinationen 192 weitere AFLP-Analysen durchgeführt. Nachdem in der vorangegangenen Einzelpflanzen-Analyse festgestellt worden war, dass die F₂-Pflanzen 148 und 98 die zum Genort nächstgelegenen Kopplungsbrüche besitzen, war es ausreichend, AFLP-Marker aus der BSA nur in diesen Einzelpflanzen zu überprüfen, um ein mögliches Ko-segregieren mit dem *def*-Locus zu ermitteln. So wurde parallel eine BSA mit einer Einzelpflanzenanalyse der F₂-Pflanzen 148 und 98 durchgeführt. Trotz mehr als 120 weiteren untersuchten mit *def* gekoppelten AFLP-Markern konnte darunter keiner gefunden werden, der in der Pflanze 148 mit dem Genort gekoppelt vorlag.

4.2.7 Zweipunktanalyse der Rekombinationsfrequenzen

Die Entfernung der AFLP-Marker zum *def*-Gen wurde in einer Zweipunktanalyse anhand der Daten aus der Aufspaltungsanalyse in der F₂ und der dort festgestellten paarweisen Rekombinationsfrequenzen ermittelt. Hierbei wurde parallel mit den Programmen MAPMAKER und JoinMap gearbeitet. In beiden Programmen wurden dieselben Ergebnisse ermittelt. Die Zweipunktanalyse unterscheidet sich in ihrem Algorithmus von der Multipunktanalyse. Sie trifft keine Aussagen über die mögliche genetische Anordnung der Marker (LANDER et al., 1987). Da es in der vorliegenden Arbeit aber in erster Linie um das Ermitteln von genetischen Entfernungen der Marker zum *def*-Genort geht, und nicht alle Marker in den Kopplungskarten integriert werden konnten, sind die Zweipunktanalysen als bedeutende Ergebnisse separat dargestellt worden. 15 Marker liegen demzufolge näher als 5 cM und zwei näher als 1 cM vom Genort entfernt.

4.2.8 Beurteilung der Rekombinationsfrequenzen der Marker zum *def*-Locus unter Berücksichtigung der F2-Pflanze 148

Insgesamt 38 gekoppelte Marker aus der ersten und weitere 120 aus der zweiten Bulk Segregant Analyse waren in der F2-Pflanze 148 untersucht worden. Keiner dieser Marker kosegregierte mit dem Genort in der Pflanze. Um eine falsche Klassifizierung der Pflanze als homozygot dominant für das *def*-Wildtypallel auszuschließen, wurden 16 weitere F3-Nachkommen der Pflanze aufgezogen und analysiert. Dadurch konnte die korrekte genotypische Klassifizierung bestätigt werden.

Wenn man nun eine gleichmäßige Verteilung der fast 160 untersuchten Marker in dem durch die BSA definierten genetischen Fenster um das *def*-Gen mit einer maximalen Größe von 40 cM annimmt, so würde der durchschnittliche Abstand zwischen den Markern 0,25 cM betragen. Das Fehlen von mit dem Gen kosegregierenden Markern in der Pflanze 148 gibt Grund zur Annahme, dass die Crossover-Bruchpunkte in dieser F2-Pflanze näher am *def*-Genort liegen müssen als die durchschnittliche Markerentfernung von 0,25 cM.

Aus diesem Grund kann man annehmen, dass die ausgewählten Marker näher am *def*-Gen platziert liegen, als es die einfache Kalkulation der Rekombinationsfrequenzen vermuten lässt.

4.2.9 Konversion von AFLP-Markern in STS-Marker und ssAFLP-Marker

Um die Analyse wichtiger Marker-Loci zu beschleunigen und zu vereinfachen wurde versucht aus eng mit dem *def*-Locus gekoppelten AFLP-Loci Sequence Tagged Site-Marker (OLSON et al., 1989, auch "Sequence Characterized Amplified Regions" SCAR, PARAN und MICHELMORE, 1992) abzuleiten. Diese Ableitung von sequenzspezifischen Primern zur singulären Amplifikation eines AFLP-Polymorphismus ist unter anderem erfolgreich für die Markierung von züchterisch wertvollen Eigenschaften (z. B. REAMON-BÜTTNER und JUNG, 2000; XU et al., 2001; AGRAMA et al., 2002), aber auch für Positionsklonierungen (SCHWARZ et al., 1999; BALLVORA et al., 2001) von Genen verwendet worden.

Die Umwandlung der polymorphen AFLP-Banden in STS-Marker ist jedoch immer wieder mit großen Schwierigkeiten verbunden (DECOSSET et al., 2000; PRINS et al., 2001) und zum Teil erfolglos versucht worden (PAUQUET et al., 2001; MIFTAHUDIN et al., 2002).

Das grundlegende Problem hierbei ist der Verlust der ursprünglich polymorphen Amplifikation

nach Spezifizierung der Primer. Zum einen können fälschlich klonierte und sequenzierte mit der polymorphen AFLP-Bande ko-migrierende Hintergrund-Fragmente für diesen Verlust des Polymorphismus verantwortlich sein. Zum zweiten können verlängerte sequenzspezifische Primer bei AFLP-Polymorphismen, die auf einem Nukleotidaustausch in einer der AFLP-Restriktionsschnittstellen beruhen, in vielen Fällen trotzdem an das Template binden und zu einer Amplifikation führen.

Es wurden verschiedene relativ aufwendige Wege beschritten, um Hintergrundsequenzen von der polymorphen Sequenz unterscheiden zu können, die unter anderem mit Southern-Hybridisierungen arbeiten (REAMON-BÜTTNER et al., 1998). Inverse PCR (BRADEEN und SIMON, 1998; WEN, 2002) TaqMan-Analyse und BAC-Sequenzierungen (MEKSEM et al., 2001) sind eingesetzt worden, um Punktmutationen in den AFLP-Restriktionsschnittstellen auszuspielen und für das Design von STS-Markern oder "Cleaved Amplified Polymorphic Sequences", CAPS zu nutzen.

Auch in der vorliegenden Arbeit führte die Spezifizierung der Primer in 9 von 12 Fällen zu dem Verlust des ursprünglichen Polymorphismus in der AFLP-Analyse. Es wurden sowohl im Wildtyp als auch in der Mutante Banden gleicher Größe amplifiziert.

In drei Fällen führte die spezifische PCR jedoch zu einer singulären Reproduktion des ursprünglichen Polymorphismus mit der gleichen Aufspaltung wie der zugrundeliegende AFLP. Dies ermöglicht eine einfache Analyse unbearbeiteter genomischer DNA mittels dieser STS-Marker, von denen zwei mit dem *def*-Wildtypallel und einer mit dem *def*-Mutantenallel in Kopplung auftreten.

Daneben wurde eine vereinfachte Methode entwickelt und angewendet, um AFLP-Banden in Einzel-PCR-Produkte umzuwandeln (VON STACKELBERG et al., im Druck). Wenn der direkte Weg AFLP-Marker in STS-Marker umzuwandeln scheiterte, wurden Primer abgeleitet und eingesetzt, die auf den ursprünglichen selektiven AFLP-Primern beruhten, die aber zusätzlich um 2 - 5 selektive Basen des sequenzierten Klons verlängert worden waren. Das theoretische Konzept dahinter ist das folgende:

Jede zusätzliche selektive Base reduziert die Gruppe der amplifizierten Fragmente im Durchschnitt um 75 %. Wenn die insgesamt sechs selektiven Basen (drei an jedem ursprünglichen selektiven AFLP-Primer) zur Amplifikation von einem Maximum von 150 Banden führen, so müssten nur vier zusätzliche selektive Basen die Anzahl an amplifizierten Banden bis auf eine einzelne Bande reduzieren. Der Polymorphismus an der

Restriktionsschnittstelle, der im Preamplifikationstemplate vorhanden ist, kann dann als Einzel-Locus dargestellt werden.

Diese Vorgehensweise führte zur Spezifizierung von 5 weiteren mit dem *def*-Locus gekoppelten AFLP-Markern. Drei dieser ssAFLP (sequence specified AFLP) benannten Marker traten mit dem Wildtypallel und zwei mit dem Mutantenallel in Kopplung auf.

4.2.10 Kopplungskarten für die Region um den *def*-Genort

Mehrfach sind die Schwierigkeiten einer Kopplungsanalyse von dominanten Markern in einer F₂-Population beschrieben worden (SÄLL und NILSSON, 1994; KNAPP et al., 1995). Rekombinationsereignisse zwischen benachbarten dominanten Markern, welche in Repulsion vorliegen, können demnach nicht korrekt ermittelt werden. Dies führt zu Verzerrungen bei der Schätzung der Entfernungen dieser Marker zueinander. Wie in den zitierten Veröffentlichungen wurde dieses Problem durch die Erstellung zweier getrennter Kopplungskarten, je einer für die Marker, deren dominantes Allel vom gleichen Elter stammt, umgangen. Dies ermöglicht auf der einen Seite eine Integration der Loci ohne eine starke Verzerrung der Karte. Auf der anderen Seite ist jedoch die Orientierung beider Karten zueinander nicht ohne weiteres zu bestimmen. Die computergestützte Ermittlung von genetischen Kopplungskarten erfolgt in einer großen Anzahl von Veröffentlichungen mit MAPMAKER (LANDER et al., 1987). Daneben wird vermehrt auch das Programm JoinMap (STAM, 1993; VAN OOIJEN und VOORIPS, 2001) verwendet, welches im Gegensatz zu dem auf dem DOS-Betriebssystem basierenden MAPMAKER auf den aktuelleren WINDOWS Betriebssystemen aufbaut. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Ermittlung der Karten parallel mit beiden Programmen, um mögliche Unterschiede in den Resultaten festzustellen.

Die Anordnung der sowohl von MAPMAKER als auch von JoinMap integrierten Loci Marker stimmt in beiden Programmen vollständig überein. Aufgrund der unterschiedlichen Vorgehensweise der Programme integriert JoinMap jedoch mehr Loci als MAPMAKER.

Die von JoinMap ermittelten Entfernungen für die Karte, der mit dem Wildtyp-Allel auftretenden Marker, war jedoch wesentlich kürzer als bei MAPMAKER. So betrug die Gesamtgröße der JoinMap-Karte mit 17,1 cM nur fast die Hälfte der MAPMAKER-Karte mit 31,4 cM. Ähnliche Unterschiede sind von SAAL (1997) beobachtet worden. Eine mit JoinMap ermittelte Karte betrug dort bei fast gleicher Anordnung der Marker nur etwa 2/3 der von

MAPMAKER ermittelten Entfernung.

Laut persönlicher Mitteilung von Herrn J. van Ooijen, der für die Entwicklung der aktuellen Version von JoinMap 3.0 zuständig ist, benutzen MAPMAKER und JoinMap unterschiedliche Funktionen zur Schätzung der Entfernungen in den Kopplungskarten. Die Karten von JoinMap sind dabei generell kürzer als die von MAPMAKER. Vergleicht man die in der Multipunktanalyse geschätzten Entfernungen beider Programme mit den Entfernungen der Zweipunktanalyse, so zeigt die von JoinMap ermittelte Karte zu diesen eine bessere Übereinstimmung.

Die Karten von MAPMAKER und JoinMap der in Kopplung mit dem Mutanten-Allel auftretenden Marker weisen starke Größenunterschiede nur auf, wenn man die gesamte Distanz beider Karten betrachtet. Da die von JoinMap erstellte Karte aber nur Loci auf der einen Seite des *def*-Gens platziert, erscheint es sinnvoll, auch nur den entsprechenden Bereich der von MAPMAKER erstellten Karte in einen Vergleich einzubeziehen. In diesem Teilbereich besteht dann mit 19,1 cM (MAPMAKER) und 16,5 cM (JoinMap) eine wesentlich bessere Übereinstimmung der Größe beider Karten.

In der Kopplungskarte der mit dem *def*-Allel des Wildtypelter DGV in Kopplung auftretenden 26 Marker konnten von MAPMAKER 12 Marker zueinander positioniert werden. 4 weitere Marker konnten in einem an den interessierenden Genort angrenzenden Intervall platziert werden. JoinMap positioniert 17 Marker um das *def*-Gen. Auffällig ist bei den Karten, dass bis auf eine Ausnahme alle Marker-Loci auf nur einer Seite des Genortes liegen.

In der Kopplungskarte der mit dem *def*-Allel des Mutantenelter PF in Kopplung auftretenden 12 Marker konnten von MAPMAKER 5 Marker zueinander positioniert werden. 3 weitere Marker konnten in einem den interessierenden Genort umschließenden Intervall platziert werden. Interessanterweise kommt JoinMap hier zu einer anderen Einschätzung. Es platziert 7 Marker nur auf der einen Seite des *def*-Locus. Um die von MAPMAKER auf der anderen Seite platzierten Marker auch mit JoinMap integrieren zu können, muss man den in der Arbeit auf restriktive 1 herabgesetzten Goodness-of-Fit-Wert ("jump") bis auf 5 heraufsetzen.

Nun könnte die Tatsache, dass das *def*-Gen in der Konsensus-Karte der Erbse am Ende der Kopplungsgruppe VII liegt (WEEDEN et al., 1998), eine Erklärung dafür liefern, dass die untersuchten Marker-Loci fast ausschließlich auf einer Seite des Genortes liegen. Je kürzer das Chromosomenstück distal zum Genort ist, desto geringer ist auch die Wahrscheinlichkeit, dort

Marker-Loci zu finden. Die Position des *def*-Locus am Ende der Kopplungsgruppe VII und das fast vollständige Fehlen von zum Genort distal platzierten Markern spiegelt wahrscheinlich die physikalische Lage des Locus am äußeren Ende des entsprechenden Chromosomenarms wider. Bezüglich der Kopplungskarten der mit dem *def*-Allel des Mutantelter PF in Kopplung auftretenden Marker, würde obige Annahme dafür sprechen, dass die von JoinMap vorgeschlagene Anordnung der Marker auf nur einer Seite des *def*-Locus der Wirklichkeit entspricht, und dass die von MAPMAKER auf der anderen Seite platzierten Marker-Loci aus einer falschen Einschätzung resultieren. In diesem Fall wäre darüberhinaus eine Orientierung der Karten von den in Repulsion auftretenden Markern zueinander möglich. So lägen die Karten bei Berücksichtigung der obigen Annahme in der Weise zueinander orientiert, wie sie im Ergebnissteil 3.2.12 (Abb. 3.28 und 3.29) dargestellt werden.

Ob die von JoinMap vorgeschlagene Anordnung der Marker in Kopplung mit dem *def*-Allel des Mutanten-Elter der realen Anordnung nahe kommt, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

4.2.11 Ausblick für den *def*-Locus

Betrachtet man die Erfolgchancen einer kartengestützten Klonierung, so ist das Verhältnis von genetischer zu physikalischer Entfernung von herausragender Bedeutung. Neuere Veröffentlichungen belegen, dass Gene sog. "hot spots" für Rekombinationsereignisse sind (SCHNABLE et al., 1998). Es wird angenommen, dass das Verhältnis von Basenpaaren zu cM in genreichen Regionen mit weniger als 200 kbp pro cM bei allen Pflanzen ähnlich ist, unabhängig von ihrer jeweiligen Genomgröße (KÜNZEL et al., 2000). Und so wird eine vergleichbare Zugänglichkeit für kartengestützte Klonierungen für diese genreichen Regionen postuliert (GILL et al., 1996).

Darüberhinaus sind mehrfach erhöhte Rekombinationsraten für distale Chromosomenregionen belegt worden (PEDERSEN et al., 1995; KÜNZEL et al., 2000; PETES, 2001).

Da das *def*-Gen in der Konsensus-Karte der Erbse (WEEDEN et al., 1998) sowohl in einer genreichen Region als auch in einer distalen Chromosomenregion liegt, kann man von einer guten Chance für ein günstiges Verhältnis von cM zu bp ausgehen, und das, obwohl die Erbse mit ungefähr $3,8 - 4,8 \times 10^9$ bp (ELLIS, 1993) ein vergleichbar großes Genom besitzt. Geht man von einem günstigen Verhältnis von weniger als 200 kbp pro cM in der Region des *def*-Locus

aus, so kann in den nächsten Schritten der Übergang von der genetischen zur physikalischen Kartierung und die Gewinnung eines den *def*-Locus überspannenden Contigs aus BAC- oder YAC-Klonen eingeleitet werden. Eine vergrößerte Anzahl an Spaltungsdaten muss hierbei jedoch die Anordnung vor allem der nächstliegenden Marker am Genort verfeinern und absichern. Sinnvoll ist weiterhin eine Integration von kodominanten sog. "Anker"-Loci wie zum Beispiel RFLP-, STS-, und SSR-Loci, um beide Karten zueinander zu orientieren. Hierbei sollte auf Marker-Loci der Erbsen Konsensus-Karte zurückgegriffen werden, um eine Anbindung des kartierten Bereiches an diese Karte zu ermöglichen. Weiterhin sind jüngst eine Anzahl von SSR-Markern dokumentiert worden, die in die Analyse mit einbezogen werden könnten (FORD et al., 2002).

Neben diesem weiteren Vorgehen in der Erbse sollte auch die kürzlich dokumentierte (GUALTERI et al., 2002) Möglichkeit einer indirekten artübergreifenden Positionsklonierung erwogen werden, die auf dem Phänomen der Mikrosyntenie zwischen der Erbse und der Modell-Leguminose *Medicago truncatula* basiert.

Literaturverzeichnis

- Agrama HA, Houssin SF, Tarek MA (2002) Cloning of AFLP markers linked to resistance to *Peronosclerospora sorghi* in maize. *Mol Gen Genom* 267: 814-819
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nuc Ac Res* 25: 3389-3402
- Aubert D, Chen L, Moon YH, Martin D, Castle LA, Yang CH, Sung ZR (2001) EMF1, a novel protein involved in the control of shoot architecture and flowering in Arabidopsis. *The Plant Cell* 13: 1865-1875
- Ballvora A, Schornack S, Baker BJ, Ganai M, Bonas U, Lahaye T (2001) Chromosome landing at the tomato *Bs4* locus. *Mol Gen Genomics* 266: 639-645
- Bassam BJ, Caetano-Anollés G, Gresshoff PM (1991), Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Ann Biochem* 196: 80-83
- Bauer D, Müller H, Reich J, Riedel H, Ahrenkiel V, Warthoe P, Strauss M (1993) Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique (DDRT-PCR). *Nuc Ac Res* 21(18): 4272-4280
- Bernier G (1988) The control of flower evocation and morphogenesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 39: 175-219
- Bertioli DJ, Schlichter UHA, Adams MJ, Burrows PR, Steinbiss HH, Antoniw JF (1995) An analysis of differential display shows a strong bias towards high copy number mRNAs. *Nuc Ac Res* 23(21): 4520-4523
- Blazquez M, Koornneef M, Putterill J (2001) Flowering on time: genes that regulate the floral transition. Workshop on the molecular basis of flowering time control. Meeting report.

EMBO reports 2(12): 1078-1082

Bonghi C, Tonutti P, Ramina A (2000) Biochemical and molecular aspects of fruitlet abscission. *Plant Growth Regulation* 31: 35-42

Bradeen JM, Simon PW (1998) Conversion of AFLP fragment linked to the carrot *Y2* locus to a simple codominant PCR-based marker form. *Theor Appl Genet* 97: 960-967

Burns CG, Ohi R, Krainer AR, Gould KL (1999) Evidence that Myb-related CDC5 proteins are required for pre-mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci* 96(24): 13789-13794

Caetano-Anolles G, Bassam BJ und Gresshoff PM (1991) DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers, *Bio/Technology* 9: 553-557

Caetano-Anolles G, Bassam BJ und Gresshoff PM (1993) Enhanced detection of polymorphic DNA by multiple arbitrary amplicon profiling of endonuclease-digested DNA: identification of markers tightly linked to the supernodulation locus in soybean. *Mol Gen Genom* 241: 57-64

Callard D, Lescure B, Mazzaloni I (1994) A method for the elimination of false positives generated by the mRNA differential display technique. *BioTechniques* 16(6): 1109-1113

Chalhoub BA, Thibault S, Laucou V, Rameau C, Höfte H, Cousin R (1997) Silver staining and recovery of AFLP amplification products on large denaturing polyacrylamide gels. *BioTechniques* 22 : 216-220

Chenchik A, Zhu YY, Diatchenko L, Li R, Hill J, Siebert PD (1998) Generation and use of high quality cDNA from small amounts of total RNA by SMART-PCR. *Gene Cloning and Analysis by RT-PCR*, Hrsg. Siebert, P & Larrick J, BioTechniques Books, MA.: 305-319

- Child RD, Chauvaux N, John K, Ulvskov P, Onckelen HA (1998) Ethylene biosynthesis in oilseed rape pods in relation to pod shatter. *J Exp Bot* 49: 829-838
- Clark SE, Williams RW, Meyerowitz EM (1997) The *CLAVATA1* gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in *Arabidopsis*. *Cell* 89(4): 575-85
- Colwyn MT, Vos P, Zabeau M, Jones DA, Norcott KA, Chadwick BP, Jones JDG (1995) Identification of amplified restriction fragment polymorphism (AFLP) markers tightly linked to the tomato *Cf-9* gene for resistance to *Cladosporium fulvum*. *The Plant Journal* 8(5): 785-794
- Coyne CJ, Pilet ML, Deniot G, Baranger A, Prioul S, McClendon MT (2000) Selected AFLP primer pairs for fine mapping in pea. *Pisum Genetics* 32: 27-30
- Decousset L, Griffiths S, Dunford RP, Pratchett N, Laurie DA (2000) Development of STS markers closely linked to the *Ppd-H1* photoperiod response gene of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor Appl Genet* 101: 1202-1206
- Diatchenko L, Lau YFC, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD (1996) Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Biochemistry* 93: 6025-6030
- Diatchenko L, Chenchik A, Siebert PD (1998) Suppression subtractive hybridization: a method for generating subtracted cDNA libraries starting from poly(A⁺) or total RNA. In *RT-PCR Methods for gene cloning and analysis*, Hersg. Siebert, P & Larrick J, BioTechniques Books MA.: 213-239
- Doss RP (1996) Differential Display without radioactivity - a modified procedure. *BioTechniques* 21: 408-412

- Doyle JJ and Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12 : 13-15
- Ellis THN (1993) The nuclear genome. In Casey R and Casey DR (Hrsg.) *Peas: Genetics, molecular biology and biotechnology*. CAB International, 13-47
- Ellsworth DL, Rittenhouse D, Honeycutt RL (1993) Artifactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. *BioTechniques* 14(2): 214-217
- Endege WO, Steinmann KE, Boardmann LA, Thibodeau SN Schlegel R (1999) Representative cDNA libraries and their utility in gene expression profiling. *BioTechniques* 26: 542-550
- ENGAGE Agro Corporation (2002) SPODNAM, For pod shatter control and improved seed quality. www.engageagro.com/media/pdf/label/spodnam_label_english.PDF
- Esch E, Weber WE (2002) Investigation of crossover interference in barley (*Hordeum vulgare* L.) using the coefficient of coincidence. *Theor Appl Genet* 104 : 786-796
- Evans LT (1971) Flower induction and the florigen concept. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 22: 365-394
- Ford R, Le Roux K, Itman C, Brouwer JB, Taylor PWJ (2002) Diversity analysis and genotyping in *Pisum* with sequence tagged microsatellite site (STMS) primers. *Euphytica* 124: 397-405
- Foucher F, Cadioux S, Courtiade J, Rameau C (2002) Cloning of genes controlling floral initiation in pea using *Arabidopsis* and *Medicago* tools. *Plant, Animal & Microbes Genome Conference*: http://www.intl-pag.org/pag/10/abstracts/PAGX_P476.html
- Garcia-Diaz CA (2000) Birdsfoot trefoil seed production. III. Seed shatter and optimal harvest time. *Crop Science* 40 (2) : 457-462

- Garcia-Mas J, Oliver M, Gomez-Paniagua HG, de Vicente MC (2000) Comparing AFLP, RAPD and RFLP markers for measuring genetic diversity in melon. *Theor Appl Genet* 101: 860-864
- Gaudin V, Lunness PA, Fobert PR, Towers M, Riou-Khamlichi C, Murray JA, Coen E, Doonan JH (2000) The expression of D-cyclin genes defines distinct developmental zones in snapdragon apical meristems and is locally regulated by the Cycloidea gene. *Plant Physiol* 122(4): 1137-48
- Gill KS, Gill S, Endo TR, Taylor T (1996) Identification and high-density mapping of gene-rich regions in chromosome group 1 of wheat. *Genetics* 144 : 1883-1891
- Giuliano G, Bartley GE, Scolnik PA (1993) Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato development. *Plant Cell* 5 (4): 379-387
- Gottschalk, W (1989) The influence of environmental factors on the action of mutant genes. Hrgb: Sharma A.K. und Sharma A. in *Advances in Cell and Chromosome Research*, 1 - 43
- Graf D, Fisher AG, Merkensschlager M (1997) Rational primer design greatly improves differential display-PCR (DD-PCR). *Nuc Ac Res* 25(11): 2239-2240
- Gualtieri G, Kulikova O, Limpens E, Dong-Jin K, Cook DR, Bisseling T, Geurts R (2002) Microsynteny between pea and *Medicago truncatula* in the *SYM2* region. *Plant Mol Biol* 50 : 225-235
- Guimaraes MJ, Lee F, Zlotnik A, McClanahan T (1995) Differential display by PCR: novel findings and applications. *Nuc Ac Res* 23(10): 1832-1833
- Gurskaya NG, Diatchenko L, Chenik A, Siebert PD, Khaspekov GL, Lukyanov KA, Vagner LL, Ermolaeva OD, Lukyanov SA, Sverdlov ED (1996) Equalizing cDNA subtraction based on selective suppression of polymerase chain reaction: cloning of Jurkat cell

- transcripts induced by phytohemagglutinin and phorbol 12-myristate 13-acetate. *Anal Biochem* 240: 90-97
- Haizel T, Merkle T, Pay A, Fejes E, Nagy F (1997) Characterization of proteins that interact with the GTP-bound form of the regulatory GTPase Ran in Arabidopsis. *The Plant Journal* 11(1): 93-103
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia Coli* with plasmids. *Journal Mol Biol* 166: 557-580
- Heller MJ (2002) DNA MICROARRAY TECHNOLOGY: Devices, Systems, and Applications. *Annu Rev Biomed Eng* 4:129-53
- Hoshino Y (1915) On the inheritance of the flowering time in peas and rice. *Journal of the College of Agriculture Hokkaido Imperial University* 6, 229 - 288, zitiert nach Murfet (1990)
- Hubner S, Smith HM, Hu W, Chan CK, Rihs HP, Paschal BM, Raikhel NV, Jans DA (1999) Plant importin alpha binds nuclear localization sequences with high affinity and can mediate nuclear import independent of importin beta. *J Biol Chem* 274(32): 22610-17
- Jackson G and Miller J (1999) Dryland spring pea variety performance trial. Western Triangle Agricultural Research Center, Research Reports and Publications, Annual Reports, www.ag.montana.edu/wtarc/Web99/Soil/pea/DLPvar99.htm
- Jako C, Teyssendier de la Serve B (1996) Cloning and characterization of a cDNA encoding a Rab1-like small GTP-binding protein from *Petunia hybrida*. *Plant Mol Biol* 31(4): 923-926
- Jin H, Martin C (1999) Multifunctionality and diversity within the plant MYB-gene family. *Plant Mol Biol* 41(5): 577-85
- Johanson U, West J, Lister C, Michaels S, Amasino R, Dean C (2000) Molecular analysis of *FRIGIDA* a major determinant of natural variation in *Arabidopsis* flowering time. *Science* 290: 344-347
- Khandka DK, Tuna M, Tal M, Nejidat A, Golan-Goldhirsh A (1997) Variability in the pattern of random amplified polymorphic DNA. *Electrophoresis* 18: 2852-2856
- Khangildin FK and Khangildin VV (1969) Woprosy genetiki i sjelekcji sjelskohozjajstwiennyh

- rastieniej, Ufa, zitiert nach Swiecicki und Wolko (1990)
- Kim JY, Chung YS, Paek KH, Park YI, Kim JK, Yu SN, Oh BJ, Shin JS (1999) Isolation and characterization of a cDNA encoding the cysteine proteinase inhibitor, induced upon flower maturation in carnation using suppression subtractive hybridization. *Mol Cells* 9: 392-397
- Knapp SJ, Holloway JL, Bridges WC, Liu BH (1995) Mapping dominant markers using F2 matings. *Theor Appl Genet* 91 : 74-81
- Konieczny A und Ausubel FM (1993) A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *The Plant Journal* 4(2): 403-410
- Koorneef M, Alonso-Blanco C, Peeters AJM und Soppe W (1998) Genetic control of flowering time in *arabidopsis*. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49: 345 - 370
- Kosambi DD (1944) The estimation of map distance from recombination values. *Ann Eugen* 12 : 172-175
- Künzel G, Korzun L, Meister A (2000) Cytologically integrated physical restriction fragment length polymorphism maps for the barley genome based on translocation breakpoints. (2000) *Genetics* 154 : 397-412
- Kvarnheden A, Yao JL, Zhan X, O'Brien I, Morris BA (2000) Isolation of three distinct CycD3 genes expressed during fruit development in tomato. *Journ Exp Bot* 51(352): 1789-97
- Lahaye T, Töpsch S, Freialdenhoven A, Schulze-Lefert P (1998) High-resolution genetic and physical mapping of the Rar 1 locus in barley. *Theor Appl Genet* 101: 255-263
- Landegren U, Nilsson M und Kwok PY (1998) Reading bits of genetic information: methods for single-nucleotide polymorphism analysis. *Genome Res* 8: 769-776
- Lander ES, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daley M, Lincoln SE and Newburg L (1987) MAPMAKER: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1 : 174-181
- Levy YY und Dean C (1998) The transition to flowering. *The Plant Cell* 10: 1973 - 1989
- Liang P, Averboukh L, Pardee AB (1993) Distribution and cloning of eucaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization. *Nuc Ac Res* 21: 3269-3275
- Liang P und Pardee AB (1992) Differential display of eucaryotic mRNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257: 967-971

- Liang P und Pardee AB (1995) Recent advances in differential display. *Curr Opin Immunol* 7: 274-280
- Liljegren SJ, Ditta GS, Eshed Y, Savidge B, Bowman JL, Yanofsky MF (2000) *SHATTERPROOF* MADS-box genes control seed dispersal in *Arabidopsis*. *Nature* 404: 766-770
- Linskens MHK, Feng J, Andrews WH, Enlow BE, Saati SM, Tonkin LA, Funk WD, Villeponteau B (1995) Cataloging altered gene expression in young and senescent cells using enhanced differential display. *Nuc Ac Res* 23(16): 3244-3251
- Lohmann J, Schickle HP, Bosch TCG (1995) REN Display, a rapid and efficient method for nonradioactive differential display and mRNA isolation. *BioTechniques* 18: 200-202
- Lynn K, Fernandez A, Aida M, Sedbrook J, Tasaka M, Masson P, Barton MK (1999) The PINHEAD/ZWILLE gene acts pleiotropically in *Arabidopsis* development and has overlapping functions with the ARGONAUTE1 gene. *Development* 126(3): 469-481
- MacLeod, J. (1981) *Harvesting. Oilseed Rape Book*, Cambridge : Cambridge Agricultural Publications, 107-119
- Malhotra K, Foltz L, Mahoney WC, Schueler PA (1998) Interaction and effect of annealing temperature on primers used in differential display RT-PCR. *Nuc Ac Res* 26(3): 854-856
- Mano Y, Kawasaki S, Takaiwa F, Komatsuda T (2001) Construction of a genetic map of barley (*Hordeum vulgare* L.) Cross 'Azumamugi' x 'Kanto Nakate Gold' using a simple and efficient amplified fragment-length polymorphism system. *Genome* 44 : 284-292
- Mao L, Begum D, Chuang H, Budiman MA, Szymkowiak EJ, Irish EE, Wing RA (2000) *JOINTLESS* is a MADS-box gene controlling tomato flower abscission zone development. *Nature* 406 : 910-913
- Martínez-Zapater JM, Coupland G, Dean C und Koorneef M (1994) The transition to flowering in *arabidopsis*. In *Arabidopsis*, Hrsgb: Meyerowitz E.M. und Somerville C.R., Cold Spring Harbor Lab. Press, 403 - 434
- Martin-Laurent F, van Tuinen D, Dumas-Gaudot E, Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi S, Franken P (1997) Differential display analysis of RNA accumulation in arbuscular mycorrhiza of pea and isolation of a novel symbiosis-regulated plant gene. *Mol Gen Genet* 256: 37-44
- Matz MV und Lukyanov SA (1998) Different strategies of differential display: areas of application. *Nuc Ac Res* 26 (24): 5537-5543

- Meijer M, Murray JAH (2000) The role and regulation of D-type cyclins in the plant cell cycle. *Plant Mol Biol* 43(5-6): 621-33
- Meksem K, Ruben E, Hyten D, Triwitayakorn K, Lightfoot DA (2001) Conversion of AFLP bands into high-throughput DNA markers. *Mol Gen Genet* 265 : 207-214
- Michaels SD und Amasino RM (1999) *Flowering Locus C* encodes a novel MADS-domain protein that acts as a repressor of flowering. *The Plant Cell* 11: 949-956
- Michaels SD und Amasino RM (2001) Loss of *Flowering Locus C* activity eliminates the late-flowering phenotype of *FRIGIDA* and autonomous pathway mutations but not responsiveness to vernalization. *The Plant Cell* 13: 935-941
- Michelmore RW, Paran I, Kesseli RV (1991) Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions using segregating populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 : 9828-9832.
- Miele G, MacRae L, McBride D, Manson J, Clinton M (1998) Elimination of false positives generated through PCR Re-amplification of differential display cDNA. *BioTechniques* 25: 138-144
- Miftahudin, Scoles GJ, Gustafson JP (2002) AFLP markers tightly linked to the aluminium-tolerance *Alt3* in rye (*Secale cereale* L.). *Theor Appl Genet* 104: 626-631
- Moden WJ, Dowding EA, Whitcraft JC, O'Keeffe LJ (1986) Lentil harvesting in the Palouse. *American Society of Agricultural Engineers Paper No. 86-1580*.
- Morant M, Hehn A, Werck-Reichhart D (2002) Conservation and diversity of gene families explored using the CODEHOP strategy in higher plants. *BMC Plant Biol* 2: 7
- Muehlbauer FJ, Summerfield RJ, Kaiser WJ, et al. 1997. *Principles and Practice of Lentil Production*. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, ARS—141, 26 pp.
- Mullis K., Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposium in Quantitative Biology* 51: 263-73
- Murfet IC, (1971) Flowering in *Pisum*: reciprocal grafts between known genotypes. *Aust J Biol Sci* 24: 1089-1101
- Murfet IC, (1990) Flowering genes in pea and their use in breeding. *Pisum Newsletter* 22: 78-85

- Murfet IC und Reid JB (1993) Developmental Mutants. In: Peas: Genetics, Molecular Biology and Biotechnology, Hrgb: Casey, R. und Davies D.R., Verlag: CAB International, 165-216
- Nishimura A, Ito M, Kamiya N, Sato Y, Matsuoka M (2002) OsPNH1 regulates leaf development and maintenance of the shoot apical meristem in rice. *The Plant Journal* 30(2): 189-201
- Ofir R, Qing W, Krup M, Weinstein Y (1997) Identification of genes induced by interleukin-3 and erythropoietin via the Jak-Stat5 pathway using enhanced differential display-reverse southern. *Interferon Cytokine Res* 17: 279-286
- Olson M, Hood L, Cantor C, Botstein D (1989) A common language for physical mapping of the human genome. *Science* 245: 1434-1435
- Paran I und Michelmore RW (1992) Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor Appl Gen* 85: 985-993
- Patterson SE (2001) Cutting Loose. Abscission and Dehiscence in Arabidopsis. *Plant Physiol* 126 : 494-500
- Patzak J (2001) Comparison of RAPD, STS, ISSR and AFLP molecular methods used for assessment of genetic diversity in hop (*humulus lupulus* L.). *Euphytica* 121: 9-18
- Pauquet J, Bouquet A, This P, Adam-Blondon AF (2001) Establishment of a local map of AFLP markers around the powdery mildew resistance gene *Run1* in grapevine and assessment of their usefulness for marker assisted selection. *Theor Appl Genet* 103: 1201-1210
- Pedersen C, Giese H, Linde-Laursen I (1995) Towards an integration of the physical and the genetic chromosome map of barley by *in situ* hybridization. *Hereditas* 123 : 77-88
- Petes TD (2001) Meiotic recombination hot spots and cold spots. *Nature Reviews* 2 : 360-369
- Philbrook, BD and Oplinger ES (1986) Soybean field losses as influenced by harvest delays. *Agron. J.* 81 : 251-258
- Pidkowich MS, Klenz JE, Haughn GW (1999) The making of a flower: control of floral meristem identity in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Sci* 4(2): 64-70
- Prins R, Groenewald JZ, Marais GF, Snape JW, Koebner RMD (2001) AFLP and STS tagging of *Lr19*, a gene conferring resistance to leaf rust in wheat. *Theor Appl Genet* 103 : 618-624
- Quackenbush J, Cho J, Lee D, Liang F, Holt I, Karamycheva S, Parvizi B, Pertea G, Sultana R,

- White J (2001) The TIGR Gene Indices: analysis of gene transcript sequences in highly sampled eukaryotic species. *Nuc Ac Res* 29(1): 159-164
- Quattrocchio F, Wing J, van der Woude K, Souer E, de Vetten N, Mol J, Koes R (1999) Molecular analysis of the anthocyanin2 gene of petunia and its role in the evolution of flower color. *Plant Cell* 11(8): 1433-1444
- Rappsilber J, Mann M (2002) What does it mean to identify a protein in proteomics? *Trends Biochem Sci* 27(2): 74-78
- Ratcliffe OJ, Nadzan GC, Reuber TL, Riechmann JL (2001) Regulation of flowering in *Arabidopsis* by an *FLC* homologue. *Plant Physiol* 126: 122-132
- Reamon-Büttner SM, Jung C (2000) AFLP-derived STS markers for the identification of sex in *Asparagus officinalis* L.. *Theor Appl Genet* 100: 432-438
- Reamon-Büttner SM, Schondelmaier J, Jung C (1998) AFLP markers tightly linked to the sex locus in *Asparagus officinalis* L.. *Molecular Breeding* 4 : 91-98
- Roberts JA, Whitelaw CA, Gonzalez-Carranza ZA, McManus MT (2000) Cell Separation Processes in Plants-Models, Mechanisms and Manipulation. *Annals of Botany* 86 : 223-235
- Rose A, Meier I (2001) A domain unique to plant RanGAP is responsible for its targeting to the plant nuclear rim. *Proc Natl Acad Sci* 98(26): 15377-82
- Rose TM, Schultz ER, Henikoff JG, Pietrokovski S, McCallum CM, Henikoff S (1998) Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences. *Nuc Ac Res* 26(7): 1628-1635
- Roux C, Bilanz J Theunissen BH, Perrot-Rechenmann C (1998) Identification of early auxin markers in tobacco by mRNA differential display. *Plant Mol Biol* 37: 385-389
- Rozental AJ (1966) Bobowyje i ziernobobowyje kultury. Moskwa, zitiert nach Swiecicki und Wolko (1990)
- Saal B (1997) Die Nutzung neuerer PCR-gestützter molekularer Markertechniken zur Erstellung einer dicht besetzten Kopplungskarte des Roggens (*Secale cereale* L.). Dissertation, Universität Hannover
- Sablowski RW, Moyano E, Culianez-Macia FA, Schuch W, Martin C, Bevan M (1994) A flower-specific Myb protein activates transcription of phenylpropanoid biosynthetic genes. *EMBO J* 13 (1): 128-137

- Säll T, Nilsson NO (1994) The robustness of recombination frequency estimates in intercrosses with dominant markers. *Genetics* 137 : 589-596
- Saint-Jore CM, Evins J, Batoko H, Brandizzi F, Moore I, Hawes C (2002) Redistribution of membrane proteins between the Golgi apparatus and endoplasmatic reticulum in plants is reversible and not dependent on cytoskeletal networks. *The Plant Journal* 29(5): 661-78
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanders PM, Lee PY, Biesgen C, Boone JD, Beals TP, Weiler EW, Goldberg RB (2000) The Arabidopsis *DELAYED DEHISCENCE 1* gene encodes an enzyme in the jasmonic acid synthesis pathway. *Plant Cell* 12 : 1041-1061
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977): DNA-sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* 74: 5463-5467
- Sävenstrand H, Brosche M, Strid A (2002) Regulation of gene expression by low levels of ultraviolet-B radiation in *Pisum sativum*: isolation of novel genes by suppression subtractive hybridisation. *Plant Cell Physiol* 43: 402-410
- Schnable PS, Hsia AP, Nikolau BJ (1998) Genetic recombination in plants. *Curr Opin Plant Biol* 1 : 123-129
- Schwarz G, Michalek W, Mohler V, Wenzel G und Jahoor A (1999) Chromosome landing at the *Mla* locus in barley (*Hordeum vulgare* L.) by means of high-resolution mapping with AFLP markers. *Theor Appl Genet* 98: 521- 530
- Shan X, Blake TK, Talbert LE (1999) Conversion of AFLP markers to sequence-specific PCR markers in barley and wheat. *Theor Appl Genet* 98 : 1072-1078
- Shannon S, Meeks-Wagner DR (1991) A mutation in the Arabidopsis *TFL1* gene affects inflorescence meristem development. *The Plant Cell* 3: 877-892
- Sheldon CC, Burn JE, Perez PP, Metzger J, Edwards JA, Peacock WJ, Dennis ES (1999) The *FLF* MADS box gene: a repressor of flowering in Arabidopsis regulated by vernalization and methylation. *The Plant Cell* 11: 445- 458
- Shiu SH, Bleecker AB (2001) Receptor-like kinases from Arabidopsis form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *Proc Natl Acad Sci* 98(19): 10763-10768
- Siebert PD, Chenik A, Kellog DE, Lukyanov KL, Lukyanov SA (1995) An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA. *Nuc Ac Res* 23: 1087-1088

- Simmons G, van der Lee T, Diergaarde P, van Daelen R, Groendijk JG, Büschges R, Hollrichter K, Töpsch S, Schulze-Lefert P, Salamini F, Zabeau M, Vos P (1997) AFLP-based fine mapping of the Mlo gene to a 30-kb DNA segment of the barley genome. *Genomics* 44: 61-70
- Simpson GG, Dean C (2002) Arabidopsis, the rosetta stone of flowering time? *Science* 296: 285-289
- Simpson GG, Gendall AR und Dean C (1999) When to switch to flowering. *Annu Rev Cell Dev Biol* 99: 519-550
- Skroch PW und Nienhuis J (1995) Impact of scoring error and reproducibility of RAPD data on RAPD based estimates of genetic distance. *Theor Appl Genet* 91: 1086-1091
- Southern E (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal Mol Biol* 98: 503-517
- Von Stackelberg M (1996) Lässt sich die strahleninduzierte Mutation *efr* mittels RAPD-Analyse molekular charakterisieren? Diplomarbeit, Universität Hannover
- Von Stackelberg M, Lindemann S, Menke M, Riesselmann S, Jacobsen HJ (im Druck) Identification of AFLP and STS markers closely linked to the *def* locus in pea. *Theor Appl Genet*
- Stam P, (1993) Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package:JoinMap. *The Plant Journal* 3(5): 739-744
- Von Stein OD, Thies WG, Hofmann M (1997) A high throughput screening for rarely transcribed differentially expressed genes. *Nuc Ac Res* 25: 2598-2602
- Strasburger E, Noll F, Schenck H, Schimper AFW (Begründer), Sitte P, Ziegler Ehrendorfer F, Bresinsky A (Neubearbeiter) Lehrbuch der Botanik. 33. Auflage (1991) Gustav Fischer Verlag 754-759
- Swiecicki WK and Wolko B (1990) Locus for the gene *def* (*DEVELOPMENT FUNICULUS*). *Pisum Newsletter* 22 : 67-68
- Takahashi T, Mu JH, Gasch A, Chua NH (1998) Identification by PCR of receptor-like protein kinases from Arabidopsis flowers. *Plant Mol Biol* 37(4): 587-96
- Tautz D (1989) Hypervariability of simple sequences as a general source of polymorphic DNA markers. *Nuc Ac Res* 17: 6463-6471
- Taylor SA und Murfet IC (1993) Flowering in pea: a mutation from Lf^d to lf^a and a summary of

- induced *Lf* mutations. *Pisum Genetics* 25: 60-63
- Thomas CM, Vos P, Zabeau M, Jones DA, Norcott KA, Chadwick BP, Jones JDG (1995) Identification of amplified restriction fragment polymorphism (AFLP) markers tightly linked to the tomato *Cf-9* gene for resistance to *Cladosporium fulvum*. *The Plant Journal* 8(5): 785-794
- Tiwari KR, Penner GA, Warkentin TD (1999) Identification of AFLP markers for the powdery mildew resistance gene *er2* in pea. *Pisum Genetics* 31 : 27-29
- Uimari A, Strommer J (1997) Myb26: a MYB-like protein of pea flowers with affinity for promoters of phenylpropanoid genes. *Plant Journal* 12(6): 1273-84
- Van Doorn WG, Stead AD (1997) Abscission of flowers and floral parts. *Journ Exp Bot* 48(309): 821-837
- Van Ooijen JW, Voorrips RE (2001) JoinMap Version 3.0, Software for the calculation of genetic linkage maps. Plant Research International, Wageningen, the Netherlands
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Freijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M, (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nuc Ac Res* 23 : 4407-4414
- Wan JS, Sharp SJ, Poirier GM, Wagaman PC, Chambers J, Pyati J, Hom YL, Galindo JE, Huvar A, Peterson PA, Jackson MR, Erlander MG (1996) Cloning differentially expressed mRNAs. *Nat Biotechnol* 14: 1685-1691
- Weber E, (1972) Grundriss der biologischen Statistik. 7. Auflage, Fischer-Verlag
- Weeden NF, Ellis THN, Timmerman-Vaughan GM, Swiecicki WK, Rozov SM, Berdnikov VA (1998) A consensus linkage map for *Pisum sativum*. *Pisum Genetics* 30 : 1 - 4
- Weissmann SM (1999) Section III. Patterns of mRNA expression. in: cDNA preparation and characterization. *Methods in Enzymology* 303: 165-392
- Weller JL, Reid JB, Taylor SA und Murfet IC (1997) The genetic control of flowering in pea. *Trends in Plant Science* 2 (11): 412 - 418
- Wen L, Tang HV, Chen W, Chang R, Pring DR, Klein PE, Childs KL, Klein RR (2002) Development and mapping of AFLP markers linked to the sorghum fertility restorer gene *rf4*. *Theor Appl Genet* 104 : 577-585
- White OE (1917) Studies of the inheritance in *Pisum*. II. The present state of knowledge of heredity and variation in peas. *Proceedings of the American Philosophical Society* 56:

- 487-588, zitiert nach Murfet (1990)
- Van Wijk KJ (2001) Challenges and prospects of plant proteomics. *Plant Physiol* 126: 501-508
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA und Tingey SV (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nuc Ac Res* 18: 6531-6535
- Williams JGK, Reiter RS, Young RM und Scolnik PA (1993) Genetic mapping of mutations using phenotypic pools and mapped RAPD markers. *Nuc Ac Res* 21(11): 2697-2702
- Woo HH, Brigham LA, Hawes MC (1995) Molecular cloning and expression of mRNAs encoding H1 histone and H1 histone-like sequences in root-tips of pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Mol Biol* 28: 1143-1147
- Xu M, Huaracha E, Schuyler SK (2001) Development of sequence-characterized amplified regions (SCARs) from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers tightly linked to the *Vf* gene in apple. *Genome* 44: 63-70
- Zhu C, Yamamura S, Koiwa H, Nishihara M, Sandmann G (2002) cDNA cloning and expression of carotenogenic genes during flower development in *Gentiana lutea*. *Plant Mol Biol* 48: 277-285
- Zhang H, Van Nocker S (2002) The *VERNALIZATION INDEPENDENCE 4* gene encodes a novel regulator of *FLOWERING LOCUS C*. *The Plant Journal* 31(5): 663-673
- Zhang Y, Stommel JR (2000) RAPD and AFLP tagging and mapping of *Beta* (*B*) and *Beta* modifier (*MoB*), two genes which influence β -carotene accumulation in fruit of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Theor Appl Genet* 100 : 368-375

Anhang

A. Ergebnisse der BLAST/EST-Homologie-Vergleiche der Klone aus der SSH-Analyse (3.1.5)

Es wurde nur eine Auswahl an Homologie-Treffern dargestellt, da teilweise weit mehr als 100 Top-Homologien zu ESTs gefunden werden. Hierbei wurden besonders Blüten-, Meristem-, Spross- und Blatt-Gewebe berücksichtigt. In der Tabelle werden die Kürzel der EST- oder cDNA-Banken angegeben aus der der homologe EST entstammt. Eine stichwortartige Definition der jeweiligen EST- oder cDNA-Bank ist im Anschluss an die Tabelle unter **B.** aufgeführt.

Tabelle Anhang 1: Auswahl von Homologie-Treffern der BLAST-Suche in den vom NCBI bereitgestellten EST-Datenbanken. * Der E-Wert entspricht dem negativen decadischen Logarithmus für die Wahrscheinlichkeit, das eine gefundene Homologie zwischen zwei Sequenzen zufällig ist. Je höher der E-Wert, desto unwahrscheinlicher also eine nur zufällige Übereinstimmung. Bei Angabe von E = 0 geht E gegen unendlich.

Sequenzname	EST/cDNA-Bank	E*	bp
3a01sp6	Developing stem	0	687
3a06sp6 3'	Developing flower, MTFLOW	55	559
3b03sp6 3'	MtBB, MtBA	95	393
3b04sp6 3'	Gm-c1065	40	383
3c01sp6	LjNEST, Developing flower	73	411
3c06sp6	Gm-c1053	130	385
3d01sp6	GPOD	120	345
3d02t7	Elicited cell culture	39	729
3d03sp6 3'	GESD	68	1,0
3d05sp6	BNIR, GESD, Developing stem	130	957
3d06t7	Developing stem, Insect herbivory	18	757
3e02sp6	MHAM, KV2	87	842
3e03sp6/t7	Gm-c1059, Gm-c1084, Gm-c1063	72	848
3e04sp6	GVN	73	331
3e05sp6/t7	Developing flower	7	830
3e06t7	Drought	0	784
3f01sp6 3'	GESD	103	978
3f02sp6	Gm-r1070	70	1,0
3f03sp6 3'	Drought, Developing leaf	165	902
3f05sp6//t7	Developing flower, MTPOSE	171	639

Sequenzname	EST/cDNA-Bank	E*	bp
3f06sp6/t7	GESD	129	912
3g01sp6 3'	Developing flower (*PopFlow 24)	162	705
3g02sp6/t7	KV3, KVO	109	949
3g03sp6/t7 3'	Gm-c1042, Gm-c1040	102	752
3g04sp6/t7 3'	BNIR, HOGA, MHAM	127	555
3g05sp6/t7	Developing leaf	125	911
3g06sp6	KVO	25	466
3h01sp6/t7 3'	Elicited cell culture, Gm-r1070	40	926
3h02sp6/t7 3'	MtBC	51	797
3h04sp6	cSTS, Phosphate starved leaf	120	388
3h06sp6/t7	KV3, Developing stem, MTGIM	22	925
IA04T7	Ljimp (*GESD, tomato flower 22)	68	1,0
IA05SP6/t7 3'	GPOD, MHAM, MtBC	82	1,1
IB01SP6/t7	Gm-c1036	76	1,1
ID03SP6/t7	DSLCL	46	1,3
IE01SP6/t7	MHAM, MtBB, MtBA, MtBC	130	1,1
IE02SP6/t7	Elicited cell culture (*tomato flower buds 22)	132	1,1
IE03T7	GVSIN, KVN, Phoma	65	1,0
IE04T7	Developing flower	15	1,1
IF01SP6/t7	KVKC, Irradiated, GLSD	0	1,1
IF02SP6/t7	Developing stem, Developing flower	95	1,1
IF03SP6/t7	MTFLOW, DSLCL, Developing flower	80	1,1
IH01SP6/t7	Developing flower, MtBB	31	1,1
IH03SP6/t7	Whero	0	1,0
IH05SP6/t7	KV3, GVSIN, Gm-r1070	110	1,1
E 8	MTPOSE	64	599
E 1 3'	KV3	128	414
D1-T7 3'	MTPOSE, DSIL	80	704
D5-T7	Gm-c1051	21	763
D8-T7	In allen Medicago-Banken	0	767

B. Definition der EST- und cDNA-Banken

Es wurde eine stichwortartige Definition der in der Homologie-Suche gefundenen EST- oder cDNA-Banken angegeben. Links steht das Kürzel und rechts die Definition der Banken. Die Definition entspricht der Originaldefinition, wie sie in der NCBI-Datenbank angegeben ist (in englisch).

Where seedling lambda ZapII cDNA library: etiolated seedlings pisum sativum

GESD: ESTs from developing reproductive tissues of *Medicago truncatula*

MtBB: *Medicago truncatula* ESTs from *Sinorhizobium meliloti*-induced root nodules

MtBA: *Medicago truncatula* ESTs from nitrogen-starved roots

MtBC: 3 weeks RNA was extracted from whole root systems, arbuscular mycorrhiza

GPOD: immature pod walls, *Med trunc.*

Elicited cell culture:

Cell cultures derived from root tissues, *Med trunc.*

Phosphate starved leaf :

above ground tissues, *Med trunc.*

BNIR: 3 week old roots , *Med trunc.*

Insect herbivory:

local and systemic leaves, *Med trunc*

Developing stem:

stem, *Med trunc.*

Drought: Plantlets, *Med trunc.*

MHAM: roots colonized with *Glomus versiforme*, *med trunc.*

KV2: Seedling roots, *Med trunc.*

MtBC: whole root systems, inoculation with *Glomus intraradices*

MHRP- : phosphate starved roots, *Med trunc.*

GVN: N₂-fixing root nodules, *Med trunc.*

GVSN: senescent root nodules

GLSD: Immature seeds; Develop. stage: 25 to 35 days after pollination

MTFLOW: flowers harvested at different stages of development

MTPOSE: pods including seeds Develop. stage: different stages of development

MTGIM: mycorrhizal roots Develop. stage: 3 weeks after inoculation

MTAMP: six week old mycorrhizal roots

Developing flower:

Contains a mixture of very young, developing, fully-opened flowers and flowers in early transition into pods. *Med trunc.*

KV0 : seedling roots, *Med trunc.*

KVKC: mixed tissues; Develop. stage: various stages

Irradiated: Seedlings were exposed either to 100 gy gamma or 0.5, 1, 5, or 10 kJ/m² UV

DSIR: roots harvested at 10 days post inoculation with *Phytophthora medicaginis*

MGHG : Roots from four day old seedlings

KV1: Seedling roots Develop. stage: 24 hours post-inoculation with *Sinorhizobium*

- meliloti
- DSLCL:** mixture of cotyledons from five days old plants and leaves from two weeks old plants
- DSIL:** cotyledons and primary leaves harvested 5 and 8 days after inoculation with *Colletotrichum trifolii*
- KV3:** Seedling roots Develop. stage: 3 days post-inoculation with *Sinorhizobium meliloti*
- HOGA:** 3 day old seedling roots
- Phoma-infected:** Medicago leaves
- Lotus japonicus young plants:**
(two-week old) Lotus japonicus flower bud cDNA: flower bud of 0.7-1.0cm in length
- LjNEST:** Lotus japonicus root nodule ESTs
- Ljirnp:** Expressed sequence tags from *Mesorhizobium loti* infected roots of Lotus japonicus
- Gm-c1053:** Whole seedling, 3 week old, Glycin max.
- Gm-c1059:** Whole seedling, 2 week old
- Gm-c1084:** Etiolated Hypocotyls
- Gm-c1063:** Germinating shoot
- Gm-c1065:** Germinating shoot
- Gm-r1030:** immature cotyledons of greenhouse grown plants
- Gm-c1055:** Mature seed pods
- Gm-c1047:** immature leaves of greenhouse grown plants, 2 week old
- Gm-c1042:** Whole seedling without cotyledons
- Gm-c1072:** 23 weeks old seedlings (with sudden death syndrome?)
- Gm-c1050:** leaf tissue at various developmental stages of greenhouse grown plants
- Gm-c1029:** very young cotyledons of greenhouse grown plants
- Gm-r1070:** selected Sequences: 2,639 sequences from immature cotyledons, 1,770 from immature seed coats, **3,938 from flowers**, and 869 from young pods.
- Gm-c1036:** somatic embryos cultured on MSD 20
- Gm-c1044:** hypocotyl etiolated seedlings
- Gm-c1027:** cotyledons of 3- and 7-day-old seedlings
- Gm-c1040:** Hypocotyl and Plumule, germinating seeds
- Gm-c1068:** Leaf, drought stressed, 1 month old plants, greenhouse grown
- Gm-c1051:** floral meristematic mRNA
- cSTS :** sprouting eyes from tubers, *Solanum tuberosum*
- tomato flower, 3 - 8 mm buds:**
Flower buds and flowers were taken from 4-8 wks old plants
- tomato flower buds 8 mm to pre-anthesis:**
Flower buds and flowers from 4-8 wks old plants
- Populus Flower:** Flower

C. Datensatz zur F2-Aufspaltung

Jeder Locus beginnt mit einem *. Danach folgt der Name des Locus. Anschliessend folgen seine Genotypen in den Einzelpflanzen. Für die Definition der verschiedenen Genotypen siehe 2.11.4

```
data type f2 intercross
220 39 0
```

```
#      1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890
1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890
1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890
1234567890 1234567890
*def     BBBBBBBBBB BBBBBBBBBB BBBBBBBBBB BBBBBBBBBB BBBBBBBBBB BBBBBBBBBB BBBBBBBBBB
BBBBBBBBBB BBBBBBBBBB BBBBBBBBBB BBBBBBBBBB BBBBBBBBBB BBBBBBBBBB BAAAAAAAAA
AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA
AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA
*ACAC270  CCCCCCCCC CCCCCCCCC CCCCCCCCC CCCCCCCCC CCCCCCCCC CCCCCCCCC CCCCCCCCC
-C-CC-CC-A C-C----- -----CCCC CCCCCCCCC CCCCCCCCC CCCCCCCCC CAACCAAAAA
AAAAACCCAC CAAACAACCA ACAAAAA-AA -----
-----
*ACAC400  CCCCCCCCC CCCCCCCCC CCCCCCCCC CCCCCCCCC CCCCCCCCC CCCCCCCCC CCCCCCCCC
-C-CC-CC-C C-C----- -----CCCC CCCCCCACC ACCCCCCCCC CCCCCCCCC CAAAAAAAC
AACAAAAAAC AACAAAAACA CC-AAAA-AA A-----
-----
*ACTA190  BBBBBBBBBB BBBBBBBBBB B--B-BBBBB BDBBBBBBB- BDBBDBBBBD BDBDBBBB-B
-B-BB-BB-B B-D----- -----BBBB BDBBBBDBB DBBBBB-BBB -B-B--DDBD -DDDDDDDDD
DDDDDDDDDD DDDDDDD-DD DD-DDDDDD DDDDDDDDD- -----
-----
*ACTA500  BDBBBBBBBB BBBBBBBBBB BDBBDBBBB BDBBBBBBBB BDBBDBBBBD BDBDBBBB-B
-B-BB-BD-D B-BD----- -----BBBB BDBBBBDBB DBBBBBBBB- -B-BB-DD-D -DDDDDDDDD
DDDDDDDDDD DDDDDDBDD DD-DDDDDD DDDDDDDDD- -----
-----
*ACTT130  BBBBBBBBBB BBBBBBBBBB BDBBDBBBB BBBBBBBBBB BDBBDBBBB BBBDBBBBBB
BBBBBBBBBB BBBBBBBBDB DDBDBBBB-- BBBBBBDBB BBBBBBBBBB BBBBBBBBBB BDDDDDDDDD
DDDDDDDDDD DDDDDDBDD DDDDDDDDDD DDDDDDD-D- -DDDDDDDDD DD-DDDDDD DDDD-DDDDD
DDDDDDDDDD D-----
*ACTT270  CCCCCCCCC CCCCCCCCC CCCCCCCCC CCCCCCCCC CCCCCCCCC CCCCCCCCC CCCCCCCCC
CCCCCCCCCA CCCCCC-C- --CC-CCC-C CCCCCCCCC CCCCCCCCCA CCC-CCCC CCAACAAAAA
AAAAAACCAA CAAACA-CCA AC-AAAAA CAAAAAAA- ----- ---AAAAA AAAA-AAAA
AAAAAAAAC A-----
*ACTT630  BBBBBBBBDB BBBBBBBBBB BBBBBBBBBB BBBBBBBBBB BBBB-DBBBB BBDBBBBBBB
BBBBBBBBBD DBBBBBBBBD BBBB-BB-- BDBBBBBB-B BBB-BBBBB BBBBBDDB BDDDDDDDDD
DDDDDDDDDD DDDDDDBDD DD-DDDDDD DDDDDDDDD- -DDDDDDDDD DDDDDDDDDD DDDD-DDDDD
DDDDDDDDDD D-----
*AGAG170  CCCCCCCCC CCCCCCCCC CCCCCCCCC CCCCCCCCC CCCCCCCCC CCCCCCCCC CCCCCCCCC
CCCCCCCCCA CCCCCC-C- --CC-CCC-C CCCCCCCCC CCCCCCCCCA CCC-CCCC CCAACAAAAA
AAAAAACCAA CAAACA-CCA AC-AAAAA CAAAAAAA- ----- ---AAAAA AAAA-AAAA
--CA-AAC-- -----
*AGAG330  CCCCCCCCC CCCCCCCCC CCCCCCCCC CCCCCCCCC CCCCCCCCC CCCCCCCCC CCCCCCCCC
CCCCCCCCCA CCCCCC-C- --CC-CCC-C CCCCCCCCC CCCCCCCCCA CCCACCC-CC CCAACAAAAA
AAAAAC-AA CAAAA-CAA -C-AAAAA CAAAAAAA- ----- ---AAAAA ACAA-AAAA
--CAAAAC-- -----
*AGAG420  BBBBBBBBBB BBBBBBBBBB BDBBDBBBB BBBBBBBB-B BDBBDBBBB BBBDBBBBBB
BBBBBBBBBB BBBBBBBB-B- --BD-BBB-B BBBBDBDBB BBBBBBBBBBD BDBBDBBBBD BDDDDDDDDD
```

DDDDDDDDDD DDDDDD-BDD DD-DDDDDDDD DDDDDDDDD- ----- ---DDDDDDDD DDDD-DDDDDD
DDDDD-DD-- -----
*AGAG730 BBBBBBBBBB BBBBBBBBBB BDBBDBBBB BBDBBBBBBB BDBB-B--B- BDBD-----
-----D-D ---DBBD-B- --BD-BBB-B BDBBDBDBB DBBBB-----D ---DBB---D BDDDDDDDDDD
DDDDDDDDDD DDDDDD-BDD -D-DDDDDD- DDDDDD-D-- ----- ---D-D-D-- -----

#*AGAT350 BBDBBBBBBB BBBBBBBBBB ----- ----- -----
----- -DDDDDDDDDD
DDDDDDDDDD- -----

*AGTA215 BBDBBBBBBB BBBBBBBBBB BDBBDBBBB BBBBBBBB-- -----
----- -BBB-B B-BBDBDBB BBBBB----- -DDDDDDDDDD
DDDDDDDDDD DDDDDDBDD -----

*AGTG150 BBBBBBBBBB BBBBBBBBBB BBBBBBBBBB BBBBBBBBBB BBBBBBBBBB BBBBBBBBBB
BBBBBBBBBB BBBBBBBBBB BBBBBBBB-B BBBBBBDBB BBBBBBBBBB BBBDBBBBBB BDDDDDDDDDD
DDDDDDDDDD DDDDDDBDD DDDDDDDDDDD DDDDDDDDD- -DDDDDDDDDD DDDDDDDDDDD DDDD-DDDDDD
DDDDDDDDDD D-----
*CAAA090 BBBBBBBBBB BBBBBBBBBB BDBB----- --BBBBB-- -----
----- -BBB-B BBBBBBDBB BBBBB----- -DDDDDDDDDD
DDDDDDDDDD -----

*CAAA290 BBBBBBBBBB BBBBBBBBBB BBBBBBDBBB BBBBBBBB-- -----
----- -BBBBB BBBBB----- -DDDDDDDDDD
DDDDDDDDDD DDDDDD-BDD -----

*CAAC570 BBBBBBBBBB BBBBBBBBBB BBBBBBBBBB BBBBBBBBBB BBBBBBBBBB BBBBBBBBBB
BBBBBBBBBB BBBBBBBBBB BBBBBBBB-B BBBBBBDBB BBBBBBBBBB BBBBBBBBBB BDDDDDDDDDD
DDDDDDDDDD DDDDDDBDD DDDDDDDDDDD DDDDDDDDD- -DDDDDDDDDD DDDDDDDDDDD -DDD-DDDDDD
DDDDDDDDDD D-----
*CTAG220 BDBBBBBBBB BBBBBBBBBB BDBBDBBBB BB-B--BB-- -----
----- -BBB-B BDBBDBDBB BBBBBBBBBB BBBBB----- -DDDDDDDDDD
DDDDDDDDDD DDDDDDBDD -----

*CTTG210 CCCCCCCCC CCCCCCCCC CCCCCCCCC CCCCCCCCC CCCCCCCCC CCCCCCCCC
-C-CCCC-C CCCCCCCCC CCCCCCCC-C CCCCCCCCC CCCCCCCCCA CCCCCCCCC CAAAAA
AAAAAACA AC-AAAAA ACAA-CAA- -AA-----

*CTTG220 BBBBBBBBBB BBBBBBBBBB BBBBBBBBBB BBBBBBB-BB BBBBBBBBBB BBBBBBBBBB
BBBBBBBBBB BBBBBBBBBB BBBBBBBB-B BBBBBBDBB BBBBBBBBD BBBBBBBBBB BDDDDDDDDDD
DDDDDDDDDD DDDDDD--DD DD-DDDDDD DDDDDDDDD- -DD-----

*CCTG410 CCCCCCCCC CCCCCCCCC CCCCCCCCC CCCCCC-- -----
----- -C-C-C CCCCC-C-CC CC-CCCCC CCCCC----- -AAAAAAAC
AAAAAACA -----

*CGAC350 BBBBBBBBBB BBBBBBBBBB BDBBBBBBBB BBBBBBBBBB BDBB-BBBBB BBDBBBBBBB
BBBBBBBBBB BBDBBBB-BB --B--BBB-B BBBBBBDB-B BBBBB-BBBD BBB-BB-DBD BDDDDDDDDDD
DDDDDDDDDD DDDDDDBDD DD-DDDDDD DDDDDDDDD- ----- ---DDDDDD DDDD-DDDDDD
DDDDDDDD-- -----
*CGAG230 BBBBBBBBBB BBBBBBBBBB BBBBBBBBBB BBBBBBBBBB BBBBBBBBBB BDBBDBBBB
BBDBBBBBBB B-BBDBBBB BBBBBBBB-B BBBBBBDBB BBBBBBBBBB BBBBBDDDBB BDDDDDDDDDD
DDDDDDDDDD DDDDDDBDD DDDDDDDDDDD DDDDDDDDD- -DDDDDDDD DD-DDDDDD DDDD-DDDDDD
DDDDDDDDDD D-----
*CGAT330 BBBBBBBBBB BBBBBBBBBB BBBBBBBBBB BBBBBBBBBB BBBBBBBBBB BBDBBBBBBB
DBBDBBBB BBBBBBBBBB BBBBBBBB-B BDBBDBDBB BBBBBBBBBB BBBBBBBBBB BDDDDDDDDDD
DDDDDDDDDD DDDDDDBDD DD-DDDDDD DDDDDDDDD- -DDDDDDDD DDDDDDDDDDD DDDD-DDDDDD

DDDDDDDDDD D-----
*CGTG350 BBDBBBBBBB BBBBDBBBB BDBBDBBDB BBDBBBBB-- -----
-----BDBBB BBBBDBBDB DBBBBBBBBB BBDBB----- DDDDDDDDD
DDDDDDDDDD DDDDDDBDD -----
*GCAG210 BBD-BBBBBB BBBBDBBBB BDBBDBBDB BB-----
----- DDDDDDDDD
DDDDDDDDDD DDDDDDBDD -----
*GCAT080 BBBBDBBBB BBBBDBBBB BBBBDBBBB BBBBDBBBB BBBBDBBBB BBBBDBBBB
BBBBDBBBB BBBBDB--BB --BB-BBB-B BBBBDB--BB BBBBDBBBB BBBBDBBBB BDDDDDDDD
DDDDDDDDDD DDDDDDBDD DDDDDDDDD DDDDDDDDD- ----- DDDDD--
*GCAT170 BBDBBBBBB BBBBDBBBB BDBBDBBDB BBBBDBBBB BDBBDBBDB BDBBDBBBB
BBBDBBDBB BBDBBDB--BB --BD-BBB-B BDBBDBBDB DBBBB----- -----BD BDDDDDDDD
DDDDDDDDDD DDDDDDBDD DBDDDDDDDD DDDDDDDDD- ----- DDDDD--
#*GCAT190 CCCCCCCCC CCCCCCCCC CCCCCCCCC CC-----
-----CCC-C CCCCCCCCC CCCC----- AAA-AAAA
AA-AAAA-AA AAAAAACAA -----
#*GCAT250 CCCCCCCCC CCCCCCCCC CCCCCCCCC CC-----
-----AAAAAAA
AAAAAAAAA -AAACAACA -----
*GCTA350 CCCCCCCCC CCCCCCCCC CCCCCCCCC CCCCCCCCC CCCCCCCCC CCCCCCCCC
CC-CCCC-C CCCC-C-CCC CCCCCCCCC-C CCCCCCCCC CCCCCCCCC CAAAAAAA
AAAAAAAAA AAAAAACAA AC-AAAAAAA AAAAAAAA- -AAAAACA AA-AAAAA AAAA-AAAA
AAAAAAAAAC A-----
*GGAC110 BBBBDBBBB BBBBDBBBB BDBBDBBBB BBBBDBBBB BDBBDBBDB BDBBDBBBB
BBBBDBBBB BBDBB--BB --B--BB-B BBBBDBBDB DBBBB----- DDDDDDDDD
DDDDDDDDDD DDDDDDBDD DDDDDDDDD DDDDDDD--
*GGAC160 BBDBBDBBB BBBBDBBBB BDBBDBBDB BBDBBDBBB BDBBDBBDB BD-DBBBBDB
BBBD-B-DB- -B-----B- -----BBB-B BDBBDBBDB DBBBB----- --DDDDDDDD
DDDDDDDDDD DDDDDDBDD D-DDDDDDDD DDDDDDD--
#*GGAC180 BB-BBBBBB BBBBDBBBB BDBBDBBBB BBDBBBB--
-----BBB-B BDBBDBBDB DBBBB----- DDDDDDDDD
DDDDDDDDDD DDDDDDBDD -----
*GGAC240 CCCCCCCCC CCCCCCCCC CCCCCCCCC CCCCCCCCC CCCCCCCCC CCCCCCCCC
CCCCCCCCC CCCCCC-CC --C--CCCC CCCCCCCCC CCCC----- AAAAAAAC
AACAAAAAC AACAAAAACA -CAAAAAAAA AAAACA--
*GGAC270 BBDBBDBBB BBBBDBBBB BDBBDBBDB BBDBBDBBB BDBBDBBDB BDBBDBBBB
BBBDBBDBB BBDBBBB-BD --B--BDB-B BBBBDBBDB DBBBB----- DDDDDDDDD
DDDDDDDDDD DDDDDDBDD DBDDDDDDDD DDDDDDD--
*GGAT470 BB-BBBBBB BBBBDBBBB BDBBDBBBB B-----
----- DDDDDDDDD
DDDDDD-DDD DDDDDDBDD -----
*GGAT620 CCCCCCCCC CCCCCCCCC CCCCCCCCC C-----
-----AAAAAC-C
CACAAAAAC AACAAAAACA -----

Danke!

Zuerst möchte ich mich sehr herzlich bei Prof. Dr. Hans-Jörg Jacobsen für die langjährige Unterstützung bedanken. Er hat mir in zeitweise doch recht unwegsamem Gelände geholfen und mir durch sein in mich gesetztes Vertrauen den Rücken gestärkt.

Herrn Prof. Dr. Schmitz danke ich sehr für seine Übernahme des Referats und die hilfreiche Durchsicht des Manuskriptes.

Ich möchte mich bei den Auszubildenden bedanken, die mir unterwegs geholfen haben. Danke Jenny, Guido, Steffi & Linda!

Frau Dr. Manoela Miranda danke ich für die Hilfe bei Sequenzierungen und Datenbankanalyse.

Frau Priv.-Doz. Dr. Elisabeth Esch und Ingo Räuber möchte ich für das Licht im Dunkel der Algorithmen danken.

Dr. Thomas Reinard möchte ich sehr dafür danken, dass er mir (obwohl es sich räumlich doch angeboten hätte) nicht die kalte Schulter zeigte. Es war ganz im Gegenteil ein sehr angenehmes Rücken an Rücken. Danke für die Hilfe, und die Freundschaft!

Danke an Ursula Hanke, die ich bewundere und die mir immer geholfen hat.

Danke an alle, die in den Jahren am Lehrgebiet mit dabei waren und den Bienenstock am Summen gehalten haben!

Oyunbileg Nyamsuren danke ich für die Liebe und vieles mehr!

Elisabeth und Ulrich von Stackelberg danke ich für alles, und das ich, ausgegangen um das Fürchten zu lernen, immer in das weiße Haus am Eingang des Dreiecks zurückkehren kann.