

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Lehrstuhl für Pflanzenzüchtung

Untersuchung der funktionellen Assoziation von
Kandidatengenomen in Zusammenhang mit der Malzqualität
der Gerste durch Transkriptomkartierung

Kerstin Krumnacker

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum
Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Agrarwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzende: Univ.-Prof. Dr. C.-Chr. Schön

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. G. Wenzel

2. Univ.-Prof. Dr. W. Back, i.R.

Die Dissertation wurde am 09.12.2008 bei der Technischen Universität Mün-
chen eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum
Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 31.03.2009
angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Gerste (<i>Hordeum vulgare</i> L.) und ihre Bedeutung.....	1
1.2	Malzqualität	2
1.3	Die Selektion auf Malzqualität	7
1.4	Molekulargenetische Untersuchungen des Gerstengenoms	11
1.4.1	Markeranalysen	11
1.4.2	QTL-Analysen	13
1.4.3	Expressionsanalysen	15
1.5	Molekulargenetische Analyse der Malzqualität	17
1.6	Ziele der Arbeit.....	20
2	Material und Methoden	22
2.1	Pflanzenmaterial	22
2.2	Feldversuche und Ermittlung agronomischer Merkmalsdaten.....	22
2.3	Kleinmälzung und Malzqualitätsanalysen.....	24
2.4	Probenahmezeitpunkt des Pflanzenmaterials für die cDNA-AFLP-Analysen	26
2.5	Molekularbiologische Arbeiten	26
2.5.1	DNA-Isolation	26
2.5.2	RNA-Isolation	27
2.5.2.1	Präparation von RNA aus Gerstenkörnern	27
2.5.2.2	DNaseI-Verdau	28
2.5.2.3	RNA-Reinigung.....	28
2.5.3	cDNA-Synthese	29
2.5.3.1	Erststrangsynthese	29
2.5.3.2	Zweitstrangsynthese	29
2.5.3.3	cDNA-Reinigung.....	29
2.5.4	Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	30
2.5.5	Markeranalysen	30
2.5.5.1	cDNA-AFLP-Marker	30
2.5.5.2	Genomische AFLP-Marker	31
2.5.5.3	SSR-Marker	32
2.5.5.4	SNP-Marker.....	33
2.5.6	Gelelektrophoretische Methoden.....	35
2.5.6.1	Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von RNA.....	35
2.5.6.2	Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA.....	36

2.5.6.3	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	36
2.5.7	Detektion und Fragmentanalyse	36
2.6	Datenauswertung	37
2.6.1	Statistische Auswertung der phänotypischen Daten.....	37
2.6.2	Molekulargenetische Kartierung	37
2.6.3	QTL-Analysen	38
2.7	QTL-basierte Fragmentanalyse	38
2.7.1	Fragmentisolierung	38
2.7.2	Klonierung von cDNA-AFLP-Fragmenten.....	39
2.7.3	DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse.....	40
2.8	Ableitung genomischer Marker aus Expressionsmarkern	40
3	Ergebnisse	43
3.1	Analyse der Malzqualität.....	43
3.1.1	Alpha-Amylaseaktivität.....	47
3.2	Analyse der agronomischen Merkmale	48
3.2.1	Korrelationen von agronomischen Merkmalen und Malzqualität.....	50
3.3	cDNA-AFLP-Analyse und molekulare Kartierung der Population	50
3.4	QTL-Analyse	53
3.4.1	QTL-Analyse der Malzqualität.....	53
3.4.1.1	VZ45°C.....	53
3.4.1.2	Proteolytische Parameter	55
3.4.1.3	Cytolytische Parameter.....	57
3.4.1.4	Amylytische Parameter	58
3.4.1.5	Malzqualitätsindex (MQI)	60
3.4.2	QTL-Analyse agronomischer Merkmale	61
3.4.2.1	Wuchshöhe	61
3.4.2.2	Zeitpunkt des Ährenschiebens.....	61
3.4.2.3	Lagerneigung	61
3.5	Einfluss von Transkriptommarkern auf die Malzqualität.....	65
3.6	QTL-basierte Fragmentanalyse	66
3.7	Ableitung von genomischen Selektionsmarkern aus polymorphen Transkripten.....	70
4	Diskussion.....	78
4.1	Phänotypische Daten der Population.....	78
4.2	cDNA-AFLP-Analyse und molekulare Kartierung der Population	81
4.3	QTL-Analyse	84

4.4	QTL-basierte Fragmentanalyse	95
4.5	Ableitung von genomischen Selektionsmarkern aus polymorphen Transkripten.....	100
4.6	Züchterische Anwendbarkeit der QTLs bzw. abgeleiteten Marker.....	102
4.7	Ausblick.....	105
5	Zusammenfassung	109
6	Summary	111
7	Literatur	113
8	Anhang.....	129
8.1	Abkürzungsverzeichnis	129
8.2	Chemikalienverzeichnis.....	131
8.3	Basislösungen	132
8.4	Lösungen für einzelne Arbeitsgänge	133

1 Einleitung

1.1 Gerste (*Hordeum vulgare* L.) und ihre Bedeutung

Gerste (*Hordeum vulgare* L.) ist mit weltweit circa 56 Millionen Hektar Anbaufläche und einem Produktionsvolumen von etwa 139 Millionen Tonnen nach Weizen, Reis und Mais die meistangebaute Getreideart (FAO, Faostat, 2006). Zu den größten Produzenten der Welt gehören Russland, Kanada und die Ukraine. In Europa zählen Frankreich und Deutschland zu den führenden Produzenten. In Deutschland wurde 2006 auf ca. 2 Millionen Hektar Gerste angebaut. Davon fielen 1,48 Millionen Hektar auf Wintergerste und 542.000 Hektar auf Sommergerste (Besondere Ernteterminung 2006; <http://www.bmelv-statistik.de>). Wintergerste wird vor allem als Futtermittel eingesetzt, die Sommergerste dient in Form von Gerstenmalz fast ausschließlich als Rohstoff für die Bierproduktion.

Gerste ist eine der ältesten Kulturpflanzen der Welt. Vor ca. 10.000 Jahren begann die Kultivierung dieser Getreideart im Nahen Osten (Salamini et al. 2002). Gerste zeichnet sich durch eine außerordentliche ökologische Anpassungsfähigkeit, eine kurze Reifezeit und ein hohes Ertragspotential aus. Deshalb ist sie eher als jede andere Getreideart für den Anbau in höheren Breitengraden, in Trockengebieten und in größeren Höhenlagen geeignet. Als eine der wenigen Kulturpflanzenarten ist sie auf allen Kontinenten anzutreffen (Von Bothmer et al. 1995).

Die Kulturgerste (*H. vulgare* L.) gehört zur Familie der Gräser (*Poaceae*). Sie ist eine monokotyledone, diploide und selbstbefruchtende Pflanze und verfügt über sieben Chromosomenpaare. Das Genom ist mit $5,1 \times 10^9$ bp im haploiden Zustand (Bennett und Leitch 1995) im Vergleich zu Weizen relativ klein.

Zentrales Zuchtziel in der Gerstenzüchtung ist neben der Sicherung und Steigerung der Erträge sowie der Verbesserung der Resistenzeigenschaften gegenüber abiotischen und biotischen Stressfaktoren vor allem die Verbesserung der Malz- und Brauqualität. Gerste ist weltweit die wichtigste Getreideart, die als Rohstoff für die Malzbereitung zur Verfügung steht. Im Jahr 2006 wurden in Deutschland ca. 1,8 Millionen Tonnen Gerste zu Malz verarbeitet. Daher kommt der Verbesserung der qualitativen Eigenschaften von Braugerste durch die Pflanzenzüchtung eine große Bedeutung zu.

1.2 Malzqualität

Die Malzqualität der Gerste ist eine sehr komplexe Eigenschaft und basiert auf einem balancierten Zusammenwirken vieler Qualitätskomponenten. Sie setzt sich aus morphologischen Merkmalen, der chemischen Zusammensetzung sowie physiologischen und enzymatischen Eigenschaften einer Sorte zusammen.

Morphologische Merkmale, die zur Beurteilung der Malzqualität herangezogen werden, betreffen die Qualität des Gerstenkorns. Beurteilt werden unter anderem Korngröße und -form, Beschaffenheit des Mehlkörpers und Spelzenfeinheit.

Die Korngröße wird als Tausendkorngewicht oder über den Vollgerstenanteil (Siebfraktion > 2,5 mm) beurteilt. Der Handel fordert einen Vollgerstenanteil von mindestens 90%. Große, vollbauchige Körner haben einen höheren Anteil an stärkereichem Endosperm, woraus eine höhere Extraktausbeute resultiert (Ulonska et al. 1966) und sie enthalten im Vergleich zu schlanken länglichen Körnern weniger Eiweiß. Als Braugersten werden nahezu ausschließlich zweizeilige Sorten eingesetzt, da durch den Anteil an Seitenkörnern bei mehrzeiligen Gersten ein ungleiches Keimbild entsteht, welches zu unerwünschtem, ungleichem Darmalz führt (Narziss 1999).

Die Struktur des Mehlkörpers ist für die Einschätzung der voraussichtlichen Vermälzbarkeit ebenfalls von Bedeutung. Zur Beurteilung werden die Gerstenkörner längs aufgeschnitten und auf mehliges oder glasiges Aussehen untersucht. Glasige Körner haben einen höheren Eiweißgehalt, gehen daher schwerer in Lösung und ergeben Malze mit ungünstigen Verarbeitungsmerkmalen.

Ein dritter Punkt der Einfluss auf die Kornqualität nimmt ist die Spelzenfeinheit des Korns. Optimal für einen reibungslosen Mälzungsprozess ist eine dünne, feine Spelze. Zu grobe Spelzen sind unerwünscht, da sich Inhaltsstoffe wie Kieselsäuren, Polyphenole und Lipide, nachteilig auf den Geschmack und die Bierstabilität auswirken. Außerdem ist die Cellulose, Hauptbestandteil der Spelzen, wasserunlöslich, bleibt im gesamten Brauprozess unverändert und verringert so den Extraktgehalt (Narziss 1999). Die Spelzen sind aber auch von technischem Nutzen. Während des Abläuterns der Würze im Sudhaus dienen sie als Filterschicht.

Zur Beurteilung der Malzqualität ist ebenso die chemische Zusammensetzung des Korns, vor allem der Stärke-, Protein- und der Beta-Glucangehalt von Bedeutung.

Wichtigster und auch mengenmäßig größter Inhaltsstoff ist die Stärke (Henry 1988). Im Laufe der Vermälzung wird diese durch Enzyme zu Einfachzuckern abgebaut, welche die Grundlage der alkoholischen Fermentierung durch die Hefe im weiteren Brauprozess bilden. Der Gehalt an Stärke im Gerstenkorn ist sowohl von genetischen Einflüssen als auch von der Umwelt abhängig und sollte möglichst hoch sein, da er positiv mit dem Extraktgehalt korreliert ist (Munck 1987). Der Stärkeanteil im Gerstenkorn liegt zwischen 58 und 64% (MacGregor et al. 1993). Die Hauptkomponenten der Stärke sind die beiden Polysaccharide Amylose und Amylopektin, die in „normalen“ Gersten in einem Verhältnis von circa 25% zu 75% vorliegen (Palmer 1983). Amylose ist ein unverzweigtes, spiraliges, aus α -(1-4)-glykosidischen Bindungen aufgebautes Polymer. Amylose ist enzymatisch schwerer zu verdauen als Amylopektin. Amylopektin besteht ebenfalls aus α -(1-4) glykosidisch verknüpften Glukoseresten, ist aber durch α -(1-6) Bindungen stärker verzweigt (Hough 1985). Stärkekörner treten im Korn in zwei verschiedenen Formen, großen und kleinen Körnern, auf. Kleine Körner haben einen höheren Amylose- und Proteingehalt und zeigen daher eine schlechtere Löslichkeit und eine stärkere Verkleisterung (Smith et al. 1987). Gersten mit hohem Proteingehalt besitzen tendenziell eine größere Menge an kleinen Stärkekörnern als solche mit niedrigem Proteingehalt (Bathgate 1973).

Auch der Proteingehalt übt einen erheblichen Einfluss auf alle Arbeitsvorgänge bei der Bierbereitung aus, insbesondere auf die Vermälzbarkeit der Gerste, auf die Hefeernährung sowie auf den Geschmack, die Stabilität und den Schaum des Bieres (Narziss 1999). Der Proteingehalt im Korn ist negativ mit dem Stärkegehalt korreliert, so dass eiweißreiche Sorten einen niedrigeren Gehalt an Stärke aufweisen als eiweißarme Sorten, was sich wiederum negativ auf das Extraktniveau auswirkt (Bishop 1930). Eiweißreiche Gersten (> 11,5%) liefern eine geringere Ausbeute an vergärbaren Kohlenhydraten. Mit Zunahme des Proteingehaltes gehen eine Reihe von technologischen Nachteilen einher. Sie benötigen unter anderem eine intensivere Vermälzung, um eine gleichgute cytolytische Lösungsfähigkeit zu erreichen (Schildbach 1971). Ein zu geringer Proteingehalt (< 9%) ist allerdings genauso wenig erwünscht wie ein zu hoher Proteingehalt, da dann eine ausreichende Hefeernährung nicht mehr gewährleistet ist und außerdem die Schaumstabilität leidet (Narziss 1999, Fox et al. 2003).

Der Proteingehalt der Gerste ist sowohl sorten- als auch umweltabhängig, wobei die Umwelt den größeren Einfluss ausübt. Wichtige Einflussfaktoren sind die Düngung, die Vorfrucht und auch die Witterung während Aufwuchs und Reife (Baumer 2006).

Ein weiterer wichtiger Faktor, der die Malzqualität beeinflusst, ist der Gehalt an Beta-Glucan der Gerste. Beta-Glucan gehört zur Rohfaserfraktion und ist der Hauptbestandteil der Zellwände im Endosperm. Diese bestehen zu 75% aus Beta-Glucan und zu 25% aus Pentosan einem weiteren Polysaccharid (Fincher 1975, Fincher und Stone 1986). Der Anteil an Beta-Glucan in der Gerste liegt bei 2-10% (Henry 1987). Sowohl der Genotyp als auch die Umwelt haben Einfluss auf dieses Merkmal (MacGregor 1991). Die Löslichkeit des Beta-Glucans hängt sowohl von der Anzahl und Struktur der (1-3) und (1-4) glykosidischen Bindungen als auch von der Länge der Moleküle ab (Izawa et al. 1993). Sehr lange Moleküle erhöhen die Viskosität wässriger Lösungen stark (Edney et al. 1988). Der Abbau während der Vermälzung sollte demnach schnell und vollständig erfolgen, da zum einen eine hohe Viskosität im weiteren Ablauf der Mälzung und der anschließenden Filtration Schwierigkeiten bereiten kann (Bourne 1982), zum anderen damit die amylolytischen Enzyme schnellen Zugang zu ihren Substraten finden.

Die Keimfähigkeit ist ebenfalls ein bedeutendes Qualitätskriterium für die Nutzung als Braugerste, da erst durch die Keimung hydrolytische Enzyme gebildet werden und die Auflösung des Mehlkörpers ermöglicht wird. Nicht gekeimte Körner, die den Mälzungsprozess durchlaufen, können mit Schimmelpilzen oder Bakterien infiziert werden und bringen Schwierigkeiten bei der Bierbereitung z.B. durch unbefriedigende Gärung mit sich (Narziss 1999). Da bei der Mälzung nur die Prozessparameter Wasser, Luftfeuchte und Zeit zur Verfügung stehen, ist die optimale Keimfähigkeit eines der wichtigsten Vorraussetzungen zur Produktion qualitativ hochwertigen Malzes. Eine Mindestkeimfähigkeit von 95% wird vom Handel gefordert.

Unter Mälzung ist das Keimen lassen von Getreide unter streng kontrollierten Umweltbedingungen zu verstehen. Durch einen gesteuerten Wechsel von Wasser- und Luftweiche wird die Keimung induziert (Abbildung 1). Die gesamte Weich- und Keimdauer beträgt insgesamt sechs bis acht Tage. Anschließend wird die Gerste

getrocknet und bei hohen Temperaturen gedarrt. Das Ziel der Vermälzung ist die Induktion von hydrolytischen Enzymen, welche die hochmolekularen Speicher- und Gerüststoffe im Korn in kleinere lösliche Einheiten spalten und so zum einen unerwünschte Stoffe abbauen und zum anderen die Umwandlung von Stärke in vergärbare Kohlenhydrate herbeiführen (Bamforth und Barclay 1993). Eine Gerste mit guter Malzqualität ist daher vor allem durch eine optimale Enzymaktivität während der Vermälzung gekennzeichnet.



Abbildung 1: Entwicklungsstadien von Karyopsen während der Vermälzung. (Foto: S. Mikolajewski 2003, Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft)

Die drei wesentlichen Vorgänge bei der Mälzung sind der Abbau der Zellwände (Cytolyse), der Proteine (Proteolyse) und der Stärkeabbau (Amylolyse). Je nach ihren Substraten lassen sich die hydrolytischen Enzyme in die Hauptgruppen der cytolytischen, proteolytischen und amylytischen Enzyme einteilen. Eine Abschätzung der Malzqualität und damit der Enzymaktivität kann in der sogenannten Kleinmälzung durch Bestimmung von Parametern, die als indirekte Indikatoren für die Enzymaktivität dienen, vorgenommen werden. Eine direkte Messung der Enzymaktivität ist extrem aufwendig und bislang nur für einige der zugrunde liegenden Enzyme möglich.

Durch den Proteinabbau lösen die proteolytischen Enzyme die Verbindung zwischen der Proteinmatrix und den Zellwänden auf. Eine schnelle Proteolyse ist daher wünschenswert, um insgesamt einen schnellen Stärkeabbau zu gewährleisten. Leitenzyme der Proteolyse sind vor allem verschiedene Endo- und Exopeptidasen (Proteasen, Carboxypeptidasen; Bamforth und Barclay 1993). Als Indikatoren für die Proteolyse dienen die Parameter „Gehalt an löslichem Stickstoff in der Würze“ und „Eiweißlösungsgrad“. Letzterer gibt den Anteil des gelösten Stickstoffs am Gesamtstickstoff an. Bei der Proteolyse muss ein Kompromiss zwischen dem Abbau der Proteine zu Aminosäuren und dem Erhalt von hochmolekularen Eiweißen gefunden werden. Diese sind notwendig um eine gute Schaumstabilität zu gewährleisten.

Andererseits dienen die Aminosäuren der Hefe als Nährstoff und sind somit für die Gärung von Bedeutung.

Der Zellwandabbau durch cytotolytische Enzyme, hier vor allem die Beta-Glucanasen, Cellobiasen, Beta-Glucan Solubilasen, Xylanasen und Arabinosidasen (Narziss 1999), muss wiederum vollständig erfolgen, damit stärkeabbauende Enzyme ihre Wirkung entfalten können. Außerdem können nicht abgebaute, hochmolekulare Zellwandbestandteile zu Schwierigkeiten bei der Filtration führen. Als Maß für die cytotolytische Lösungsfähigkeit werden in der Kleinmälzung die Parameter „Brabender“ (Malzhärte), „Friabilimeter“ (Malzmürbigkeit) und „Viskosität“ ermittelt (Baumer und Lenz 1991). Je härter das Malz ist, desto aufwendiger ist das Mahlen und, umso langsamer geht das Malz in Lösung. Die Viskosität gibt Hinweise auf, die noch in der Lösung enthaltene unerwünschte Menge an hochmolekularem Beta-Glucan (Burger und LaBerge 1985).

Die Aktivierung und Bildung der amylytischen Enzyme stellt die wichtigste Aufgabe bei der Mälzung dar (Narziss 1999). Der Abbau der Stärke erfolgt hauptsächlich durch Alpha- und Beta-Amylasen, Alpha-Glukosidasen und Grenz-Dextrinasen (Narziss 1999, Bamforth and Barclay 1993). Gersten mit guter Malzqualität zeichnen sich durch eine hohe Alpha- und Beta-Amylaseaktivität aus (Narziss 1999). Als Indikatoren für amylytische Lösungseigenschaften dienen in der Kleinmälzung der „Extraktgehalt“, „Amylaseaktivitäten“ und der „Endvergärungsgrad“. Der Extraktgehalt beschreibt den Anteil aller aus dem Malz gelösten Stoffe (v.a Zucker aber auch Eiweiße, Vitamine, Mineralien, Aromastoffe). Der Endvergärungsgrad ist ein Indikator für den Anteil des vergärbaren Extraktes. Vergärt werden nur Zucker, die aus der Stärke des Malzes gebildet wurden. Je stärker ausgeprägt die Amylyse ist, umso höher liegen Extraktgehalt und Endvergärungsgrad.

Ein weiterer sehr bedeutender Parameter, der in der Kleinmälzung erhoben wird, ist die VZ45°C (Hartongindex). Der Index beschreibt den Anteil vergärbaren Extraktes bei 45°C im Vergleich zu dem bei 65°C. Je höher die VZ45°C, desto leichter ist die Stärke in der Gerste enzymatisch angreifbar (Kessler 2006). Der Index macht daher eine gute Aussage über die Lösungsfähigkeit und die Enzymkraft des Malzes (Narziss 1999).

Eine Indexzahl in der die Malzqualität zusammengefasst wird, der sogenannte „Malzqualitätsindex“, wird seit 1989 zur Sortenbewertung in den Braugersten-jahrbüchern in Deutschland angegeben. Der Malzqualitätsindex setzt sich mit unterschiedlicher Gewichtung aus den Parametern Friabilimeter, Extrakt, Endvergärungsgrad und VZ45°C zusammen.

Tabelle 1 gibt einen Überblick über die Beurteilung der in der Kleinmälzung erhobenen Parameter.

Tabelle 1: Beurteilung, der in der Kleinmälzung erhobenen Merkmale (Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Herz et al. 2006).

Merkmale	günstig	ungünstig
VZ45°C (%)	> 45	< 35
Rohprotein (%)	bis 10,5	über 11,5
Löslicher Stickstoff (mg)	> 650	< 550
Eiweißlösungsgrad (%)	um 42	< 35
Friabilimeter (%)	91-100	< 70
Brabender (Nm)	bis 100	> 130
Viskosität (mPas)	< 1,53	> 1,69
Extrakt (%)	> 82	< 79
Endvergärungsgrad (%)	> 82	< 79
Alpha-Amylaseaktivität (DBE)	50	30
Malzqualitätsindex	8,1-9,0	< 5

1.3 Die Selektion auf Malzqualität

Die Verbesserung der Malzqualität ist ein zentrales Zuchtziel in der Gerstenzüchtung. Die Malzqualität ist eine sehr komplexe Eigenschaft, die sich aus vielen Einzelmerkmalen zusammensetzt und durch eine große Anzahl von Genen beeinflusst wird. Sie wird daher auch als eines der züchterisch am schwersten zu bearbeitenden Merkmale angesehen.

Die Züchtungsziele liegen vor allem in einem hohen Extraktgehalt, einem niedrigen Eiweißgehalt, sehr guten Lösungseigenschaften (Cytolyse, Proteolyse, Amylolyse), guter Kornausbildung, niedrigem Spelzengehalt und einer angepassten Keimruhe.

Ein Einstieg in die Qualitätsselektion ist erst in sehr späten Generationen möglich, da für eine genaue Qualitätsanalytik große Mengen an Saatgut benötigt werden.

Die Schätzung der Malzqualität in jungen Generationen (F_2 - F_7) erfolgt vor allem visuell durch Bonituren der in Kapitel 1.2 beschriebenen äußeren Kornmerkmale. Zu Beginn eines Zuchtprogramms wird insbesondere auf agronomische Eigenschaften, wie Standfestigkeit und Resistenzen, selektiert. Erste Hinweise auf die Malzqualität schon in jungem Zuchtmaterial liefert die Nah-Infrarot-Transmissionsspektroskopie, ein Schnelltest zur Bestimmung von bestimmten Inhaltsstoffen (Grauf 1996). Mit dieser Methode können Inhaltsstoffe von Gerste und Malz, wie Protein- und Stärkegehalt ohne Materialverbrauch am ganzen Korn gemessen werden. Sie liefert gute Korrelationen zum Extraktgehalt ($r > 0,8$) und damit können Brau- und Futtergersten frühzeitig und an nur geringen Kornmengen voneinander unterschieden werden (Baumer et al. 1997).

In der F_5 -Generation können erstmals cytolytische Eigenschaften mit dem Brabender (Grauf 1996) untersucht werden. Mit diesem Gerät wird die Härte des Malzes geprüft. Die ermittelte Malzhärte ist mit allen wichtigen Qualitätsparametern hochsignifikant korreliert (Baumer et al. 1997).

Ein zuverlässigeres Bild über die Malzqualität lässt sich aus der Kleinmälzung gewinnen, in der spezielle Inhaltsstoffe, die Enzymaktivität und physikalische Eigenschaften der Linien bestimmt werden (Abbildung 2). Da hier relativ große Mengen an Saatgut (ca. 100 g-1 kg) benötigt werden, ist eine genaue Analyse erst in späten Generationen (F_7) des Zuchtprogramms möglich. Die in der Kleinmälzung erhobenen Parameter sind in Kap. 1.2 beschrieben worden. Sie ergeben ein relativ genaues Bild der Malzqualität einzelner Zuchtstämme.



Abbildung 2: (1) Kleinmälzungsanlage der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft, (2) Anordnung der Keimbehälter in der Anlage, (3) Keimbehälter mit Mälzproben (Fotos: S. Mikolajewski 2003, Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft).

Alle zur Beurteilung der Malzqualität herangezogenen Merkmale zeigen eine quantitative Ausprägung und unterliegen sowohl genetischen wie auch Umwelteinflüssen. Außerdem treten starke Genotyp \times Umwelt Interaktionen auf (Hayes

et al. 1993, Han et al. 1995, Herz 2000, Molina-Cano et al. 2007). Vor allem die Witterung während der Kornfüllungsphase hat großen Einfluss auf die Zusammensetzung des Gerstenkorns und somit auf die zu erwartende Vermälzbarkeit (Fox et al. 2003). Die Heritabilitäten für die verschiedenen Malzqualitätsparameter liegen im niedrigen bis mittleren Bereich (Thomas et al. 1996, Mather et al. 1997, Swanston et al. 1999, Herz 2000). Die Zusammensetzung der Varianzkomponenten für die einzelnen Malzqualitätsparameter wurde in mehrjährigen Versuchen an der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft untersucht und ist in Abbildung 3 dargestellt.

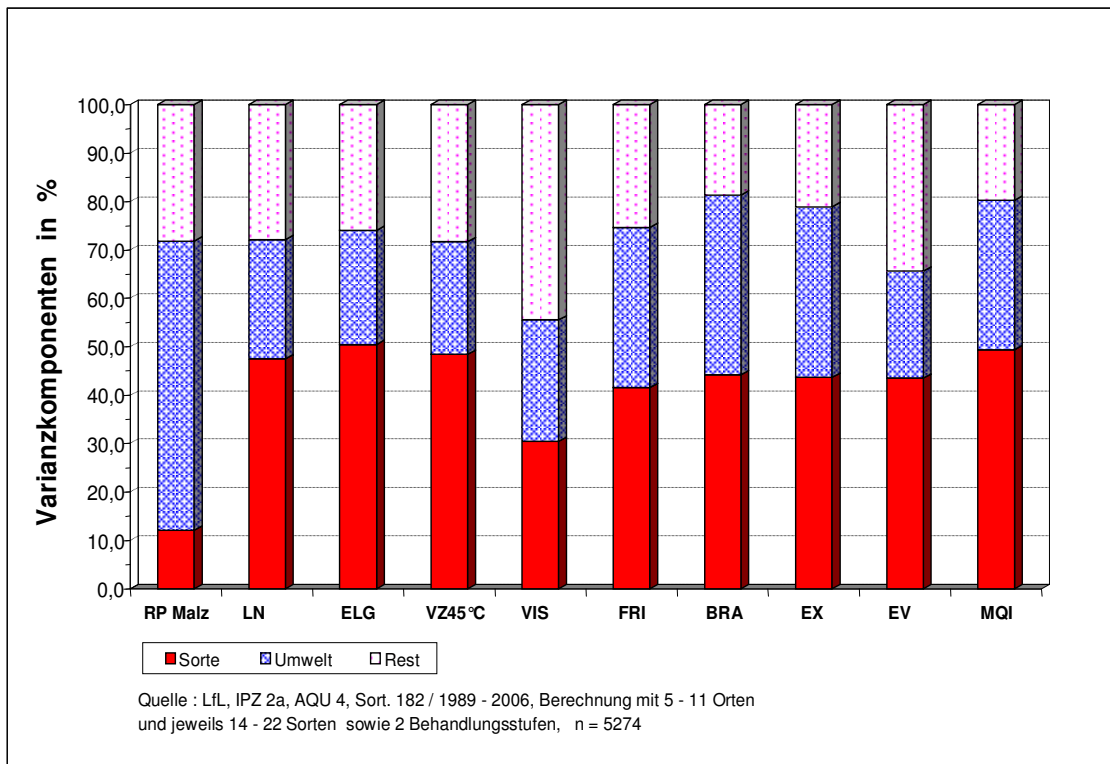


Abbildung 3: Varianzkomponenten der einzelnen Malzqualitätsparameter, ermittelt in mehrjährigen Versuchen. (Abkürzungen: RP Malz: Rohproteingehalt; LN: Gehalt an löslichem Stickstoff; ELG: Eiweißlösungsgrad; VIS: Viskosität; BRA: Brabender; FRI: Friabilimeter; EX: Extraktgehalt; EV: Endvergärungsgrad; MQI: Malzqualitätsindex).

Abbildung 3 verdeutlicht den Einfluss des Genotyps wie auch der Umwelt auf die einzelnen Merkmale. So wird der Rohproteingehalt in weitaus größerem Maß von der Umwelt beeinflusst als alle anderen Merkmale. Die proteolytischen Parameter (LN und ELG) und die VZ45°C zeigen dagegen eine große Abhängigkeit vom Genotyp.

Für eine verlässliche Einschätzung der Malzqualität sind aufgrund der genannten Faktoren Daten aus möglichst vielen Umwelten nötig. Für fundierte Aussagen werden bis zu zehn Standorte angestrebt (Hartl et al. 2000). Im Zusammenhang mit der großen Menge an Saatgut, die benötigt wird und die dadurch eine fundierte Selektion in frühen Generationen verhindert, sowie den aufwendigen Analyseverfahren zur Ermittlung der unterschiedlichen Parameter ist die Evaluierung von Genotypen hinsichtlich ihrer Malzqualität mittels Kleinmälzung langwierig, arbeitsaufwendig und teuer. Eine Kleinmälzungsanalyse der oben genannten Parameter kostet derzeit um die 80 €/Genotyp und Umwelt (Gebührenordnung der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft 2006).

Für die Züchtung wäre es von Vorteil bereits an geringen Kornmengen, in großen Serien und in frühen Zuchtstufen analytisch fundierte Hinweise auf die Differenzierung der Malzqualität zu erhalten (Narziss 1999). Die Entwicklung von Testverfahren, die es Züchtern ermöglichen sehr früh im Verlauf des Züchtungsprozesses ungeeignete Linien auszusortieren, ist daher ein dringendes Ziel in der angewandten Züchtungsforschung. Die markergestützte Selektion stellt einen wichtigen Ansatz dar, diesem Ziel näher zu kommen.

Eine indirekte Selektion auf Malzqualität über molekulare Marker wäre aus mehreren Gründen von Vorteil. Sie ist dann sinnvoll wenn die Merkmalerhebung in unterschiedlichen Umwelten durch Umwelt \times Genotyp Wechselwirkungen schwer reproduzierbar oder eine aufwendige und zeitintensive Versuchsmethodik erforderlich ist (Collard et al. 2005). Die markergestützte Selektion (MAS) unterliegt keinerlei Beeinflussung durch Umwelteffekte, ist in allen Entwicklungsstadien möglich und kann bereits in frühen Generationen der Zuchtprogramme durchgeführt werden. Die Selektionseffizienz kann damit insgesamt erhöht werden, da unerwünschte Genotypen schon früh eliminiert werden und so Zeit, Platz und Arbeitsaufwand entweder gespart werden können oder eine höhere Anzahl an Genotypen geprüft werden kann. Die MAS ermöglicht weiterhin eine gezielte Pyramidisierung und Kombination von vorteilhaften Genen. Da sich die Züchtung von Braugersten seit mehr als 80 Jahren auf Kreuzungen innerhalb adaptierten Materials konzentriert (Fischbeck 1992) und Parameter der Malzqualität wie Eiweißlösungsgrad, Extrakt, Rohproteingehalt oder Friabilimeter als Einzelmerkmale nahezu optimiert sind, sind weitere Qualitätsverbesserungen nur durch

Neukombinationen möglich, die durch Selektionsmarker schnell und effizient detektiert werden könnten.

1.4 Molekulargenetische Untersuchungen des Gerstengenoms

1.4.1 Markeranalysen

Eines der grundlegenden Ziele von molekularen Genomanalysen ist die Aufklärung der genetischen Basis phänotypischer Merkmale und damit letztendlich die Identifizierung und Lokalisierung von Kandidatengen, die für die Ausprägung des Merkmals von Bedeutung sind. DNA-Polymorphismen, die mit diesen eng gekoppelt bzw. in diesen lokalisiert sind, können in Zuchtprogrammen für eine markergestützte Selektion genutzt werden.

Der erste Schritt zur Identifizierung relevanter Genomregionen für das betreffende Zielmerkmal ist meist die Erstellung einer Chromosomenkarte mittels molekularer Marker. Seit der Kartierung der ersten molekularen Marker, die auf Basis von RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms) im „Human Genome Project“ entwickelt wurden (Botstein 1980), wird die Kopplungsanalyse und die Erstellung von genetischen Karten auch in allen landwirtschaftlich relevanten Organismen durchgeführt.

Die Grundlage aller molekularen Markersysteme sind Sequenzunterschiede in der DNA verschiedener Individuen oder Linien. Molekulare Marker sind in allen Geweben und Entwicklungsstadien nachweisbar, zeigen keine epistatischen Wechselwirkungen oder Wechselwirkungen mit der Umwelt und sind theoretisch in unbegrenzter Anzahl vorhanden.

Die ersten genetischen Karten der Gerste, die einen Großteil des Genoms abdeckten, wurden auf Basis von RFLP-Markern entwickelt (Graner et al. 1991, Kleinhofs et al. 1993). Diese Methode der Markeranalyse ist sehr arbeits- und zeitintensiv. Mit Entwicklung der PCR-Technik kamen neue Markertechniken auf, die eine leichtere Handhabung versprachen und höhere Polymorphiegrade zeigten als die RFLP-Marker. Zu nennen sind hier vor allem die AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)- und SSR (Simple Sequence Repeats)-Marker. Ein Großteil der erstellten Chromosomenkarten der Gerste zur Identifizierung relevanter genomischer Regionen für die Ausprägung bestimmter Zielmerkmale, besteht aus einer Kombination von AFLP- und SSR-Markern (Hori et al. 2005, Grando et al. 2005). Das Grundgerüst der

Kopplungskarte in der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls mit diesen Markersystemen erstellt.

Die AFLP-Methode wurde für pflanzliche Genome erstmals 1995 von Vos et al. beschrieben. Mit dieser Technik ist es möglich schnell und effizient eine große Zahl von molekularen Markern zu generieren, ohne dass eine Zielsequenz bekannt sein muss (Zabeau und Vos 1993). Damit ist die Methode gut als Grundlage zur Erstellung von Kopplungskarten geeignet. Erste Kartierungen in Gerste mittels der AFLP-Technik wurden von Becker et al. (1995b) und Qi et al. (1998) durchgeführt. Aus AFLP-Fragmenten, die eine Assoziation zu interessierenden Zuchtmerkmalen zeigen, können nach Klonierung und Sequenzierung allelspezifische diagnostische Marker abgeleitet werden (Shan et al. 1999, Brugmans et al. 2003).

Mikrosatelliten- bzw. SSR-Marker sind kurze, wiederholte Sequenzmotive, die gleichmäßig über das Genom verteilt sind (Wang et al. 1994). Die Polymorphie dieser Marker wird durch die unterschiedliche Anzahl der Wiederholungen verursacht. Mikrosatelliten weisen einen hohen Polymorphiegrad auf, sind codominant auswertbar, multi-allelisch und locusspezifisch, d.h. sie ermöglichen eine Zuordnung von Kopplungsgruppen zu Chromsomen. Erste SSR-Kartierungen in der Gerste wurden von Becker und Heun (1995a) und Liu et al. (1996) durchgeführt. Mittlerweile ist eine große Anzahl von Mikrosatellitenmarkern für Gerste verfügbar (Struss und Plieske 1998, Pillen et al. 2000, Ramsey et al. 2000, Thiel et al. 2003, Li et al. 2003b). Mikrosatelliten der neueren Generation wurden größtenteils aus Expressed Sequenced Tags (ESTs), d.h. auf Grundlage von exprimierten Gensequenzen entwickelt. ESTs werden aus bestimmten Geweben oder nach gezielter Induktion generiert und die Sequenzen in Datenbanken gespeichert. Diese Marker haben den Vorteil, dass sie in konservierten codierenden Regionen des Genoms liegen und dadurch eine bessere Übertragbarkeit auf andere genetische Hintergründe gegeben ist (Kota et al. 2001). Varshney et al. veröffentlichten 2007 eine Konsensus-Karte, in der mehr als 775 SSR-Marker integriert wurden.

Ein vergleichsweise neues Markersystem sind die SNP-Marker (Single Nucleotide Polymorphism), welche auf einzelnen DNA-Basenaustauschen innerhalb eines genomischen Abschnittes beruhen. Von allen Polymorphismen sind SNPs die häufigste

genetische Variation. In Gerste ist durchschnittlich alle 200- 240 bp ein SNP zu finden (Kota et al. 2001, Rostoks et al. 2005). SNP-Marker sind in der Regel biallelisch und daher gut für Hochdurchsatzverfahren geeignet (Michalek 2006). Durch technische und methodische Entwicklungen in den letzten Jahren wurde diese Quelle der genetischen Variation direkt dem Genotypisieren zugänglich und steht als Markersystem zur Verfügung. Es existieren verschiedenste Methoden zur Detektion von SNPs wie Pyrosequenzierung (Ahmadian et al. 2000), D-HPLC (Kota et al. 2001) oder TaqMan (Livak et al. 1995, 1999). Ein Überblick über die methodischen Möglichkeiten geben Chen und Sullivan (2003) und Giancola et al. (2006). Mittlerweile sind genetische Karten auf Basis von SNPs für Gerstenpopulationen verfügbar (Kota et al. 2001, 2007, Rostoks et al. 2005, Stein et al. 2006), wobei ein Großteil der SNP-Marker ebenfalls aus EST-Sequenzen abgeleitet wurde. Die Methode der SNP-Genotypisierung bietet außerdem die Chance, aus bereits bekannten Kandidatengensequenzen für die jeweiligen Zielmerkmale, durch vergleichende Sequenzierung funktionelle Marker und Assays zur routinemäßigen Analyse dieser SNP-Marker zu entwickeln. Polymorphismen, die sich innerhalb von Sequenzen der betreffenden Gene befinden, werden auch als „perfekte“ Marker bezeichnet, da eine hundertprozentige Assoziation mit dem Zielmerkmal gegeben ist. Paris et al. (2002) entwickelten anhand eines funktionellen SNPs innerhalb eines für eine *Beta-Amylase* codierenden Gens ein Testsystem, mit dem sehr schnell und effizient auf Malzqualität selektiert werden kann. Die verschiedenen Allele bzw. Haplotypen bedingen unterschiedliche Thermostabilität des Enzyms, was wiederum einen großen Einfluss auf die Malzqualität der Genotypen hat (Eglinton et al. 1998, Herz et al. 2005).

1.4.2 QTL-Analysen

Agronomisch und ökonomisch bedeutende Merkmale der Kulturpflanzen zeigen in den meisten Fällen eine quantitative Vererbung, d.h. sie werden durch mehrere Gene beeinflusst und sind im Gegensatz zu monogen vererbten Merkmalen nicht durch eine einfache Einordnung der Segregationsdaten des Merkmals in die Kopplungskarte lokalisierbar. Um relevante Genombereiche, sogenannte QTLs (Quantitative trait loci, Sax 1923), welche für die Ausprägung dieser Merkmale von Bedeutung sind, zu detektieren, werden die Markerdaten einer Population mittels statistischer Methoden mit den phänotypischen Daten des Zielmerkmals innerhalb der Population verglichen.

Mittlerweile stehen eine große Anzahl von Verfahren und Algorithmen für eine QTL-Analyse zur Verfügung. Eine der ersten Methode zur QTL-Detektion war die Einzelmarkerregression (Soller et al. 1976), bei der überprüft wird, ob eine signifikante Assoziation zwischen einem Markergenotyp und der Ausprägung des Zielmerkmals vorliegt. Eine genaue Lokalisierung eines QTLs ist mit dieser Methode allerdings nicht möglich, da nicht zwischen dem Effekt eines Markers und der Position relativ zum Marker unterschieden werden kann. Um diese Schwierigkeit zu überwinden wurde die Intervallkartierung entwickelt. Bei dieser Methode werden Intervalle zwischen benachbarten Markern auf das Vorhandensein eines QTLs untersucht (Simple Interval Mapping (SIM), Lander und Botstein 1989, Haley und Knott 1992). Damit können Rückschlüsse auf die Rekombination zwischen Marker und QTL gezogen werden. Allerdings werden bei der einfachen Intervallkartierung keine potentiellen weiteren QTLs im genetischen Hintergrund der Population berücksichtigt und in das Verfahren mit einbezogen. Eine Weiterentwicklung und Verbesserung der einfachen Intervallkartierung ist mit der Betrachtung von zusätzlichen QTLs oder Markern als Cofaktoren, zur Berücksichtigung des genetischen Hintergrundes, zu erreichen (Jansen und Stam 1994, Zeng 1994, Kao et al. 1999). Mit dem Computerprogramm MultiQTL (Korol et al. 2005), das eine multiple Intervallkartierung (MIM) durchführt, werden die Chromosomen iterativ auf die Präsenz eines QTL untersucht, während gleichzeitig QTL-Effekte anderer Chromosomen in die Analyse einbezogen werden. Verglichen mit dem „Composite Interval Mapping“ (CIM, Zeng 1994), einem alternativen Verfahren, bei dem einzelne Marker als Cofaktoren genutzt werden, ist das MIM noch präziser und leistungsfähiger (Kao et al. 1999). Einen Überblick über die unterschiedlichen Verfahren, die Faktoren, welche die Genauigkeit der QTL-Analysen beeinflussen sowie über die Anwendungsmöglichkeiten in der Pflanzenzüchtung geben Asins et al. (2002) und Collard et al. (2005).

Obwohl in den letzten Jahren eine große Anzahl von QTL-Studien für wichtige Eigenschaften der Gerste durchgeführt wurde und mit den Mikrosatelliten Markersysteme zur Verfügung stehen, die alle Voraussetzungen für eine schnelle und effiziente Genotypisierung ermöglichen, wird momentan eine markergestützte Selektion nicht im großem Umfang in der Gerstenzüchtung durchgeführt (Thomas et al. 2003, Rae et al. 2007). Diese Situation hat mehrere Gründe. Molekulare Marker, die in einer

markergestützten Selektion Anwendung finden sollen, müssen eine Reihe von Bedingungen erfüllen. Selektionsmarker müssen eine möglichst enge Kopplung mit dem QTL/Gen des Zielmerkmals zeigen. Außerdem sollten sie in verschiedenen genetischen Hintergründen genutzt werden können und eine einfache und unkomplizierte Handhabung versprechen. Der Großteil der Marker, die bis dato zur Verfügung stehen, liegen anonym im Genom, sind meist nur spezifisch für den jeweiligen genetischen Hintergrund, in dem die QTL-Analyse durchgeführt wurde, und zeigen keine funktionelle Assoziation mit dem Zielmerkmal. Dies limitiert den Einsatz der MAS für QTLs wichtiger Eigenschaften der Gerste.

1.4.3 Expressionsanalysen

Durch die fortschreitende Entwicklung in den Biowissenschaften unter anderem auf der methodischen Ebene und mit Aufkommen der „functional genomics“-Verfahren besteht nunmehr die Möglichkeit, gezielt Kandidatengene für die jeweiligen Zielmerkmale durch Genexpressionsanalysen zu identifizieren, daraus allelspezifische Marker abzuleiten und diese in genetische Karten zu integrieren. Mit diesem Verfahren entwickelte Marker, die eine direkte funktionelle Assoziation mit QTLs für das jeweilige Merkmal zeigen, repräsentieren potentiell geeignetere Kandidaten für eine Anwendung in markergestützten Zuchtprogrammen.

In den letzten zehn bis fünfzehn Jahren wurden verschiedene Verfahren und Plattformen zur Transkriptomanalyse entwickelt, mit denen eine "globale" Erfassung des Genexpressionsstatus und damit der Genaktivität eines Organismus unter definierten Bedingungen möglich geworden ist. Zu diesen zählen unter anderem cDNA-AFLP-Analysen (Bachem et al. 1996), Macroarrays (Desprez et al. 1998), Microarrays (Schena et al. 1995) oder SAGE (serial analysis of gene expression; Velculescu et al. 1995). Eine Übersicht über die Anwendungsmöglichkeiten der „functional genomics“-Verfahren in der Getreidezüchtung geben Varshney et al. (2007a) und Sreenivasulu et al. (2008).

In der vorliegenden Arbeit wurden Genexpressionsanalysen mittels der cDNA-AFLP-Technik durchgeführt. Diese gelbasierte Methode erlaubt die Identifizierung und Visualisierung von exprimierten Transkripten, welche unter definierten Bedingungen generiert wurden. Im Wesentlichen wird bei dieser Methode ein Standard AFLP-Protokoll (Vos et al. 1995) auf cDNA angewendet. Es sind keinerlei

Sequenzinformationen vor der Analyse nötig (Breyne et al. 2003). Mit dieser Technik können theoretisch alle zu einem bestimmten Zeitpunkt aktivierten Gene, einschließlich selten exprimierter oder noch unbekannter Gene, dargestellt werden. Im Gegensatz dazu werden in Microarrayanalysen nur exprimierte Gene detektiert, die bereits bekannt sind und sich auf dem Array befinden (De Diego et al. 2006). Die cDNA-AFLP-Methode ist bei vorhandener Grundausstattung relativ einfach und ohne größere Kosten durchzuführen. Vorteilhaft gegenüber den auf Hybridisierung beruhenden Microarrays sind die geringen Mengen an RNA, die für die cDNA-Synthese benötigt werden, sowie die Unabhängigkeit von existierenden EST-Datenbanken und cDNA-Bibliotheken (Vuylsteke et al. 2006). Da die cDNA-AFLP-Technik ein gelbasiertes Verfahren ist, müssen interessante, differentiell exprimierte Fragmente anschließend aus dem Gel isoliert und sequenziert werden, um Informationen zur möglichen Funktion zu erlangen. Wie für die genomischen AFLPs ist es dann bei den cDNA-AFLPs auch möglich, interessante Transkripte in genomische, allelspezifische Marker umzuwandeln (Korell et al. 2008).

Diese Technik kann für verschiedenste Fragestellungen eingesetzt werden. So wurde mittels cDNA-AFLP die differentielle Genexpression während der Samenkeimung in *Arabidopsis* (De Diego et al. 2006) aber auch in Gerste (Mikolajewski et al. 2002, Leymarie et al. 2007) untersucht. Brugmans et al. (2002) entwickelten mittels cDNA-AFLP-Analysen das Verfahren der Transkriptomkartierung. Dies ist eine Methode, bei der polymorphe Transkripte, durch eine Genexpressionsanalyse in einer spaltenden Population generiert, für eine genetische Kartierung genutzt werden. Die durch spezifische Induktion aktivierten Gene werden mittels cDNA-AFLP-Analyse identifiziert. Die Autoren zeigten, dass polymorphe cDNA-AFLP-Fragmente, sogenannte TDFs (Transcript derived Fragments), die in spaltenden Populationen generiert werden, kartiert werden können und sich so als Marker Chromosomenbereichen zuordnen lassen, die mit dem spezifisch induzierten Merkmal assoziiert sind. Dieser Ansatz wurde von Fernandez-del-Carmen et al. (2007) im Zusammenhang mit einer BSA (Bulked segregant analysis) ebenfalls bei Kartoffeln genutzt, um QTL-Bereiche für die Knollenentwicklung mit cDNA-AFLP-Markern, und damit mit potentiellen Kandidatengen für das Merkmal, anzureichern.

Vuylsteke et al. (2006) zeigten in ihrer Studie, dass es möglich ist cDNA-AFLP-Fragmente, generiert in einer spaltenden Population, quantitativ auszuwerten und diese

als eQTLs, im Sinne des „genetical genomics“-Ansatzes (Jansen und Nap 2001), zu verrechnen.

1.5 Molekulargenetische Analyse der Malzqualität

Da die Malzqualität aufgrund der aufwendigen und teuren Phänotypisierung ein ideales Merkmal für die markergestützte Selektion darstellt, wurden molekulargenetische Analysen dieser komplexen Eigenschaft schon sehr früh und intensiv durchgeführt. Weltweit beschäftigen sich verschiedene Arbeitsgruppen mit der Untersuchung molekularer Grundlagen der Malzqualität. Vor allem in den USA, Europa und Australien wurden umfangreiche molekulargenetische Studien durchgeführt, in denen eine große Anzahl von unterschiedlichen Malzqualitätsparametern untersucht wurde.

Eine der ersten und auch umfangreichsten QTL-Studien zur Malzqualität wurde im Rahmen des „North American Barley Genome Mapping“-Projektes mit einer sechszeiligen Steptoe (Futtergerste) × Morex (Braugerste) Population durchgeführt (Hayes et al. 1993, Han et al. 1995). Mit Ausnahme der USA wird sechszeilige Gerste für die Malzbereitung jedoch nur in sehr geringem Umfang genutzt. In weiteren amerikanischen Studien wurden sowohl rein zweizeilige Gerstenpopulationen (Mather et al. 1997) als auch Populationen mit sechszeiligen und zweizeiligen Kreuzungseltern (Marquez-Cedillo et al. 2000, Edney et al. 2004) in Bezug auf Malzqualität analysiert. Oziel et al. (1996) untersuchten eine Kreuzungspopulation aus Sommergerste und Wintergerste auf QTLs für Malzqualität.

In Europa durchgeführte Studien konzentrierten sich auf Kreuzungen von zweizeiligen Sommergersten (Chalmers et al. 1993, Thomas et al. 1996, Bezzant et al. 1996, Swanston et al. 1999, Moralejo et al. 2004, Molina-Cano et al. 2007). Li et al. (2005) und von Korff et al. (2008) führten QTL-Analysen der Malzqualität in „Advanced Backcross“-Populationen (Tanksley und Nelson 1996) aus Kreuzungen deutscher Elitebraugersten mit Wildgerste (*H. spontaneum*) durch, um vorteilhafte Allele aus exotischem Material zu identifizieren.

Im „Australian National Barley Molecular Marker Program“ (Langridge et al. 2003) ist das wichtigste Ziel die Identifizierung von Loci, die eine Korrelation mit Malzqualitätsmerkmalen zeigen. Molekulare Marker, die mit diesen assoziiert sind, sollen anschließend in australischen Gerstenzuchtprogrammen im Rahmen einer

markergestützten Selektion implementiert werden. Mit der Strategie, Populationen aufzubauen und zu analysieren, in denen ein Elter eine australische Gerstensorte repräsentiert und der Kreuzungspartner entweder eine europäische bzw. amerikanische Hochqualitätsgerste oder aber eine Wildgerste ist, wurden zahlreiche QTLs für unterschiedliche Malzqualitätsmerkmale detektiert (Barr et al. 2003, Karakousis et al. 2003, Li et al. 2003a, Panozzo et al. 2007).

Ein Überblick über die bisherigen QTL-Analysen zur Malzqualität liefern Zale et al. (2000), Hayes et al. (2003), Fox et al. (2003) und Backes et al. (2006). Insgesamt lassen sich folgende zusammenfassende Aussagen machen. Es wurden zahlreiche QTLs mit moderaten Effekten für eine große Anzahl von Malzqualitätsparametern detektiert, die auf allen Chromosomen lokalisiert waren. Es konnten jedoch Genomregionen definiert werden, in denen zahlreiche überlappende QTLs, identifiziert in verschiedenen Populationen, lokalisiert waren bzw. „Hot Spots“ bildeten. Einige dieser Cluster cosegregierten mit bereits bekannten und kartierten Kandidatengen der Malzqualität.

Die größte Anzahl von QTLs für die Malzqualität wurde bisher auf Chromosom 5H detektiert (Oziel et al. 1996, Molina-Cano et al. 2007, Hayes et al. 2003). Hier sind es drei Chromosomenregionen, die Centromer- und die beiden Telomerregionen, in denen QTLs clustern. Auf Chromosom 7H konnten ebenfalls in der Centromerregion, am *Alpha-Amylase2*-Locus, zahlreiche QTLs für verschiedene Parameter der Malzqualität (Hayes et al. 1993, Han et al. 1995) detektiert werden. Wichtige, die Malzqualität beeinflussende Genomregionen auf Chromosom 1H, sind in der Centromerregion (Li et al. 2005, Panozzo et al. 2007) und am *Hordein*-Locus auf dem kurzen Arm des Chromosoms identifiziert worden (Hayes et al. 1993, Oziel et al. 1996). Auf Chromosom 2H sind vor allem in Populationen aus zweizeiligen und sechszeiligen Kreuzungseltern Malzqualitäts-QTLs, am *vrs1*-Locus lokalisiert (Marquez-Cedillo et al. 2000, Edney et al. 2004). Dieses Gen codiert für die Zwei- bzw. Sechzeiligkeit der Gerste. Bedeutende QTLs für die Malzqualität auf Chromosom 4H wurden im Bereich des *mlo*-Locus (Bezant et al. 1997, Marquez-Cedillo et al. 2000) und am Ende des langen Chromosomenarms in der Region des *Beta-Amylase1*-Locus (Hayes et al. 1993, Karakousis et al. 2003) lokalisiert. Der *Alpha-Amylase1*-Locus auf Chromosom 6H ist ebenfalls eine Genomregion, in der QTLs für verschiedene Malzqualitätsparameter identifiziert wurden (Marquez-Cedillo et al. 2000). In europäischen Sommergerstenkreuzungen wurden Qualitäts-QTLs auch im Bereich des *denso*-Locus

(Thomas et al. 1996, Bezant et al. 1997) auf Chromosom 3H kartiert. Dieses Verzweigungsgen ist in vielen europäischen Sommergerstensorten vorhanden.

Mittlerweile ist eine große Anzahl von Kandidatengen für die Malzqualität bekannt und auf den Gerstenchromosomen lokalisiert (Von Wettstein-Knowles et al. 1992, Fox et al. 2003, Hayes et al. 2003). In den bisher durchgeführten QTL-Studien hat sich gezeigt, dass in einigen Fällen QTLs für die Malzqualität mit bereits bekannten Genen cosegregieren. Der größte Teil der detektierten QTLs zeigt jedoch keine Überlappungen mit bereits bekannten Genen und dies lässt darauf schließen, dass eine wesentlich größere Zahl an Genen für die Malzqualität von Bedeutung ist als die bis dato Identifizierten und Kartierten.

Durch die rasante technische Entwicklung in den letzten Jahren und der Möglichkeit von „globalen“ Transkriptomanalysen wurden mittels Genexpressionsanalysen während der Keimung und Mälzung, bis dato zahlreiche weitere Kandidatengene identifiziert, die zu bestimmten Zeitpunkten der Keimung oder des Vermälzungsprozesses exprimiert werden.

Neben den bereits bekannten, für die Malzqualität eine große Rolle spielenden, Kandidatengen, wie beispielsweise Alpha- und Beta-Amylasen, Beta-Glucanasen, Alpha-Glucosidasen und Proteinasen, wurden zahlreiche weitere Gene mit Hilfe verschiedener Plattformen zur Expressionsanalyse detektiert. Potokina et al. (2002) führten zur Untersuchung der Genexpression in verschiedenen Stadien der Keimung eine Transkriptomanalyse mittels Macroarrays durch und detektierten differentiell exprimierte Gene, die vor allem für Proteine aus den Bereichen Zellteilung und Proteintranslation, Kohlenhydrat-, Aminosäure- und Nukleotidstoffwechsel sowie Proteaseinhibitoren und Speicherproteine codieren. Diese Ergebnisse wurden von weiteren Expressionsstudien während Keimung oder Mälzung mittels Microarrays (Watson et al. 2005, Lapitan et al. 2006) und SAGE (White et al. 2006) bestätigt. In Untersuchungen zur Samenkeimung und Keimruhe in Gerste mit der cDNA-AFLP-Technik konnten außerdem differentiell exprimierte Transkripte identifiziert werden, die eine Rolle in der Signaltransduktion spielen (Leymarie et al. 2007).

Ein Großteil der bisher durchgeführten „klassischen Transkriptomanalysen“ in bestimmten Stadien der Vermälzung macht allerdings keine Aussage über die

Assoziation zwischen den exprimierten Kandidatengen und der Malzqualität. Sie geben keinen Aufschluss darüber, welchen Einfluss die detektierten Kandidatengene auf die phänotypische Ausprägung der Malzqualität haben.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Kombination aus Transkriptomanalyse mittels cDNA-AFLP und QTL-Kartierung für die Malzqualität durchgeführt, mit dem Ziel exprimierte Gene während des Mälzungsprozesses zu detektieren, diese mit der phänotypischen Variation innerhalb einer Population zu korrelieren, und wenn möglich, potentielle Selektionsmarker für Malzqualitätsparameter zu entwickeln.

Unter der Annahme, dass ein großer Teil der Gene, die für die Malzqualität verantwortlich sind, während des Vermälzungsprozesses induziert wird, stellt eine cDNA-AFLP-Analyse von direkt aus dem laufenden Vermälzungsprozess entnommenen Proben einen vielversprechenden Ansatz zur Identifizierung von mit Malzqualität korrelierten Kandidatengen dar.

1.6 Ziele der Arbeit

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag auf der Durchführung einer „Transkriptomkartierung“ bezüglich Malzqualität innerhalb einer Braugerstenpopulation (Alexis × Steina).

Zu diesem Zweck sollte eine Genexpressionsanalyse mittels cDNA-AFLP-Technik, von zu einem bestimmten Zeitpunkt aus dem Vermälzungsprozess entnommenen Proben aller DH-Linien der Alexis × Steina Population, durchgeführt werden. Identifizierte, polymorphe cDNA-AFLP-Marker sollten zusammen mit genomischen AFLP- sowie SSR- und SNP-Markern kartiert und eine „Transkriptomkarte“ entwickelt werden. Um den Einfluss polymorpher Transkripte auf Parameter der Malzqualität genauer zu untersuchen, sollte eine anschließende QTL-Analyse für die Malzqualität durchgeführt werden. Transkriptommarker, die enge Kopplungen zu quantitativen Effekten zeigten, sollten isoliert, kloniert und sequenziert werden, mit dem Ziel Kandidatengene für Malzqualität zu identifizieren und aus diesen Sequenzen, wenn möglich, allelspezifische Marker abzuleiten.

In einem weiteren Teil der Arbeit sollte zusätzlich eine QTL-Analyse für die agronomischen Merkmale Zeitpunkt des Ährenschiebens, Wuchshöhe und Lagerneigung in der Alexis × Steina Population durchgeführt werden, um Erkenntnisse

über die Vererbung dieser Merkmale im vorliegenden Pflanzenmaterial zu gewinnen, sowie um mögliche Zusammenhänge und Korrelationen dieser Merkmale mit den Parametern der Malzqualität aufzudecken.

Grundlegendes Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen breiten Überblick über die Verteilung von Einflussfaktoren auf wichtige quantitative Merkmale in einer Gerstenpopulation, hervorgegangen aus Elitebraugersten, zu geben sowie Assoziationen von QTLs mit den durch die Kleinmälzung spezifisch generierten Transkriptommarkern aufzudecken.

2 Material und Methoden

2.1 Pflanzenmaterial

Ausgangsmaterial für die Transkriptomkartierung und die anschließende QTL-Analyse war eine Alexis × Steina Population bestehend aus 132 DH-Linien. Alexis (Beschreibende Sortenliste des Bundessortenamtes (BSA) zugelassen 1986) und Steina (Beschreibende Sortenliste zugelassen 1980) sind beide zweizeilige Sommergersten mit guter Malzqualität, die unterschiedliche Malzqualitätstypen repräsentieren. Alexis ging aus einer Kreuzung Br1622 × Trumpf hervor, der zweite Populationselter Steina wurde aus einer Kreuzung (Sultan × St. 434/62) × (Voldagesen × Carlsberg × Volla) entwickelt. Alexis besitzt eine sehr starke allgemeine Enzymausstattung (VZ45°C) und sehr gute proteolytische Eigenschaften. Auch zeigt sie einen hohen Extraktgehalt, einen günstigen Endvergärungsgrad und einen sehr guten Friabilimeterwert. Alexis ist Träger des *denso*-Verzweigungsgens und hat daher eine niedrige Wuchshöhe, ist standfest und besitzt das *mlo*-Resistenzgen gegen den Echten Mehltau (*Erysiphe graminis* ssp. *Hordei*). Steina besitzt im Gegensatz zu Alexis geringere Enzymkräfte (VZ45°C), schwächere proteolytische Fähigkeiten und eine geringere Malzmürbigkeit. Die Sorte zeigt ebenfalls sehr gute Extraktwerte und hohe Endvergärungsgrade. Steina hat eine mittlere Halmlänge.

2.2 Feldversuche und Ermittlung agronomischer Merkmalsdaten

In den Jahren 1994, 1995, 1996, 2005 und 2006 wurde die DH-Population der Kreuzung Alexis × Steina im Feld angebaut, um sie anschließend auf Malzqualität zu prüfen (Abbildung 4). Die pflanzenbaulichen Maßnahmen wurden ortsüblich durchgeführt. Der Anbau erfolgte an allen Standorten in 5-15 m² großen Parzellen, um genügend Saatgut für die späteren Malzqualitätsanalysen zu generieren. Im Jahr 1994 wurden aufgrund von Saatgutlimitierungen nur 55 DH-Linien am Standort Freising (Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Bayern) in einer Standardanlage (ohne Wiederholung) angebaut. 1995 wurde die gesamte DH-Population in einem Alpha-Design mit zwei Wiederholungen am Standort Freising (Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Bayern) geprüft. Im Jahr 1996 wurde die DH-Population in Freising

(Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Bayern), in Irlbach (Saatzucht Ackermann, Bayern), in Peine (Cebeco, Niedersachsen) und in Hohenheim (Universität Hohenheim, Baden-Württemberg) ebenfalls in einem Alpha-Design mit zwei Wiederholungen angebaut.

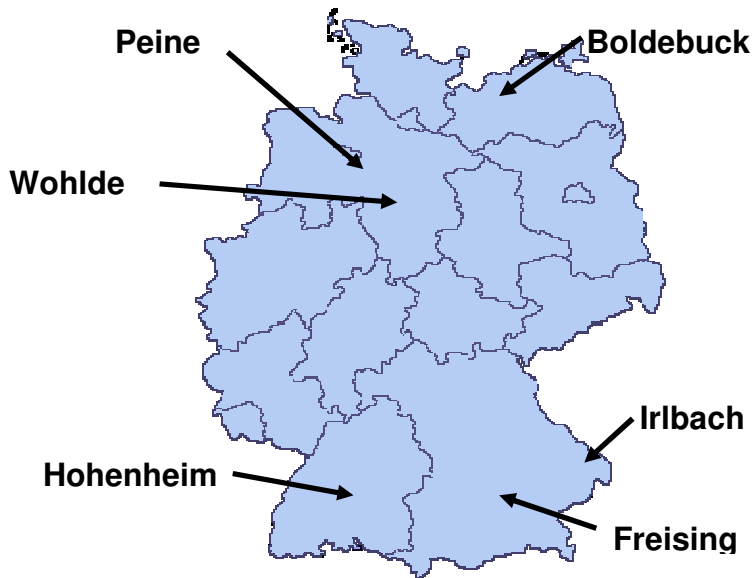


Abbildung 4: Standorte für die Feldversuche

Der Standort Freising wurde komplett vermälzt, die Standorte Hohenheim, Irlbach und Peine wurden wegen Kapazitätsbeschränkungen jeweils nur in einer Wiederholung vermälzt. Die phänotypischen Daten dieser Umwelten wurden bereits für Analysen der Malzqualität genutzt (Kipp 1998, Hartl et al. 2000).

In den Jahren 2005 und 2006 fanden nochmals Feldversuche mit der DH-Population in Freising in einer randomisierten Blockanlage in zwei Wiederholungen statt. Die Wiederholungen 2005 wurden einzeln vermälzt, die Wiederholungen des Standortes Freising 2006 wurden gemischt und anschließend vermälzt. Insgesamt standen so Malzqualitätsdaten aus acht Umwelten zur Verfügung.

Zur Analyse agronomischer Merkmale (Wuchshöhe, Zeitpunkt des Ährenschiebens, Lagerneigung) lagen Daten aus weiteren Umwelten vor. Zusätzlich wurde die Alexis × Steina Population 2006 in Wohldede (Lochow-Petkus, Niedersachsen) und 2007 in Freising (Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Bayern) noch einmal in einer randomisierten Blockanlage mit zwei Wiederholungen angebaut. Da Alexis Träger des *denso*-Verzweigungsgens ist und eine wesentlich kürzere Halmlänge als Steina hat,

konnte der *denso*-Locus im Feld mit einer 1/0 Bonitur ausgewertet und als morphologischer Marker mitkartiert werden.

Das Merkmal Wuchshöhe (WH, gemessen als Distanz vom Boden bis zur Mitte der Ähre in cm) wurde neben dieser qualitativen Auswertung in drei Umwelten (Freising 2005, 2006, 2007) auch quantitativ erhoben. Die Erfassung der Merkmale Zeitpunkt des Ährenschiebens (AES, in Tagen nach dem 01. Januar) und Lagerneigung (LA, Bonitur 1=0%; 9=100%) erfolgte in vier Umwelten. Hier lagen Daten aus Freising 2005, 2006 und 2007 sowie aus Wohlde 2006 vor.

2.3 Kleinmälzung und Malzqualitätsanalysen

Die Kleinmälzung erfolgte jeweils mit 250 g Körnern der Siebfraction über 2,5 mm in einer vollautomatischen Kleinmälzungsanlage (Phoenix Systems, Australien) nach MEBAK-Richtlinien (Mittleuropäische Brautechnologische Analysenkommission, MEBAK 1997, Tabelle 2). Dabei wurden die Keimbehälter in gleichmäßigen Zeitintervallen auf einer Zeitbasis von 256 Sekunden mit einer Geschwindigkeit von einer Umdrehung pro Minute gedreht. Der Ablauf der Kleinmälzung wird im Folgenden dargestellt.

Tabelle 2: Darstellung des Kleinmälzungsschemas, mit den verschiedenen Zyklen, wie in der vorliegenden Arbeit verwendet.

Zyklus	Dauer	Temperatur	Rel. Feuchte
Erste Wasserweiche	5 h	bei 14°C	
Erste Luftweiche	19 h	bei 14°C	98%
Zweite Wasserweiche	4 h	bei 14°C	
Zweite Luftweiche	20 h	bei 14°C	98%
Dritte Luftweiche	24 h	bei 14°C	98%
Keimung	72 h	bei 14°C	98%
Gesamtdauer	144 h		
Erste Darre	14 h	bei 50°C	
Zweite Darre	1 h	bei 60°C	
Dritte Darre	1 h	bei 70°C	
Vierte Darre	9 h	bei 80°C	
Abkühlphase	1 h	bei 20°C	

Nach den Luftweichen 1-3 wurden die Proben einzeln auf einen Weichgrad von 45% durch automatisches Aufspritzen von Wasser eingestellt. Damit wurde gewährleistet, dass alle Proben einen Feuchtigkeitsgehalt von 45% in den keimenden Körnern hatten. Nach der Darre wurden die Wurzelkeime von den Malzkörnern geputzt und das Malz vermahlen. Die Kongressmaische und die Untersuchungen der Malzqualitätsmerkmale erfolgten nach MEBAK (1997, Tabelle 3). Dazu wurden 10 g Feinschrot mit 40 ml Wasser 30 min bei 45°C in einem Maischbad inkubiert. Der Anstieg der Maische auf 70°C erfolgte mit einer Rate von 1°C/min. Nach 55 min Inkubationszeit wurden die Maischbehälter mit weiteren 20 ml Wasser aufgefüllt. Es wurden die proteolytische, cytolytische und amylolytische Lösungseigenschaften ermittelt.

Tabelle 3: Auflistung der untersuchten Malzqualitätsmerkmale und die Methoden ihrer Messung.

Merkmale	Einheit	Code	Messung nach	Umwelten
Proteolytische Merkmale:				
- Rohproteingehalt des Malzes	%	RP	MEBAK 2.5.2.1	8
- Gehalt an löslichem Stickstoff	mg	LN	MEBAK 4.1.4.5.2.1	8
- Eiweißlösungsgrad (Kolbachindex)	%	ELG	MEBAK 4.1.4.5.3	8
Cytolytische Merkmale:				
- Malzkornmürbigkeit (Friabilimeter)	%	FRI	MEBAK 4.1.3.6.1	8
- Malzkornhärte (Brabender)*	Nm	BRA	s.u.	8
- Viskosität der Würze	mPas	VIS	MEBAK 4.1.4.4.2	8
Amylolytische Merkmale:				
- Extraktgehalt im Feinschrot	%	EX	MEBAK 4.1.4.2.2	8
- Endvergärungsgrad	%	EV	MEBAK 4.1.4.10	8
- Alpha-Amylaseaktivität	DBE	AA	MEBAK 4.1.4.7.1	1
- Extraktgehalt in der Maische nach 1 h bei 45°C (VZ45°C, Hartongindex)	%	VZ	MEBAK 4.1.4.11	7
- Malzqualitätsindex**	-	MQI	s.u.	8

*Der Brabender-Härteprüfer misst die Energie, die zur Zerkleinerung von 12 g Grobschrot (25%) auf einen Feinmehlanteil von 90% erforderlich ist, indem der Zeigerausschlag eines Elektrodynamometers während des Mahlvorganges kontinuierlich elektronisch erfasst wird.

**Aus der Summe bestimmter Merkmale lässt sich der Malzqualitätsindex (MQI) errechnen, in dem die Merkmale nach linearer Transformation der Parameter zu Punkten mit unterschiedlicher Gewichtung eingehen. Der MQI ist ein allgemeines Maß für die Brauqualität einer Gerste.

$$\text{MQI} = 1,5 \times (\text{Hartong-Punkte}) + 1,5 \times (\text{Friabilimeter-Punkte}) + 3 \times (\text{Extrakt-Punkte}) + 1 \times (\text{Endvergärungs-Punkte})$$

2.4 Probenahmezeitpunkt des Pflanzenmaterials für die cDNA-AFLP-Analysen

Für die cDNA-AFLP-Analyse wurde Material der Population des Standorts Freising 2005 verwendet. Es wurden Proben (ca. 3 g) aller DH-Linien und der Eltern aus beiden Wiederholungen 24 h nach Beginn der Vermälzung direkt aus der Kleinmälzung entnommen (Abbildung 5) und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die RNA wurde aus den Proben der ersten Wiederholung isoliert.

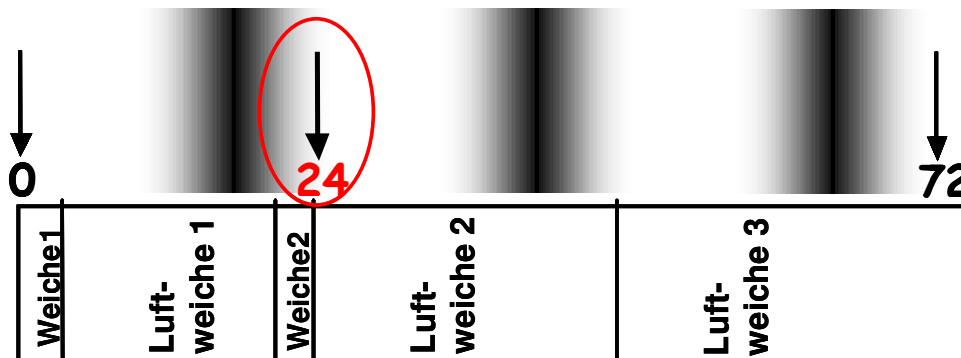


Abbildung 5: Probenahmezeitpunkt im Laufe der Vermälzung

2.5 Molekularbiologische Arbeiten

2.5.1 DNA-Isolation

Die Isolierung der DNA erfolgte modifiziert nach Anderson et al. (1992). Von jungen Gerstenpflanzen (ca. 8 Tage) wurde Blattmaterial (ca. 6 cm Blattsegment) entnommen,

für 2 Tage in einer Gefriertrocknungsanlage (Labconco, UniEquip) im Vakuum bei -42°C und 13 mbar getrocknet und anschließend in einer Kugelmühle (MM2000, Retsch) für 2 min gemahlen.

Zum gemahlene Pflanzenmaterial wurde 1000 µl Extraktionspuffer mit Natriumbisulfid (3,8 g/l) gegeben und das Gemisch im Wasserbad für 20 min bei 65°C inkubiert. Nach dem Abkühlen der Proben wurde 1000 µl Chloroform-Isoamyl (24:1) zum Puffergemisch gegeben und 15 min im Überkopfschüttler (Reax2, Heidolph) inkubiert. Die Phasentrennung erfolgte durch 15-minütiges Zentrifugieren bei 10.000 rpm und anschließend wurde die wässrige Phase in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden mit 1 µl RNase versehen und bei Raumtemperatur für 30 min verdaut. Die genomische DNA wurde anschließend durch Zugabe von 750 µl Isopropanol gefällt, kurz invertiert und durch Zentrifugieren (2 min, 10.000 rpm) sedimentiert. Der Überstand wurde abpipettiert und es erfolgte der erste Waschschriff durch Zugabe von 500 µl Natriumacetat in 76%igem Ethanol. Nach einer Inkubation von 30 min und einer anschließenden Zentrifugation (2 min, 10.000 rpm) wurde der Waschpuffer verworfen und es folgte der zweite Waschschriff. Dieser bestand aus 250 µl Ammoniumacetat in 76%igem Ethanol, der nach 3 minütiger Einwirkzeit und 2 Minuten zentrifugieren (10.000 rpm) ebenfalls verworfen wurde. Das DNA-Pellet wurde letztmalig mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen, unter Vakuum ließ man das restliche Ethanol verdampfen und das getrocknete Pellet wurde in 50-200 µl TE-Puffer über Nacht bei 4°C gelöst. Zur Abschätzung der Konzentration wurde die DNA in einem 0,8%igem Agarosegel (Kapitel 2.5.6.2) aufgetrennt, die Konzentration mit Hilfe eines Standards (Lambda/HindIII, Eurogentec, Belgien) geschätzt und anschließend auf die gewünschte Konzentration von 50 ng/µl eingestellt.

2.5.2 RNA-Isolation

2.5.2.1 Präparation von RNA aus Gerstenkörnern

Für die RNA-Isolation wurden vier vermälzte Körner pro DH-Linie und der Kreuzungseltern (ca. 400 mg) unter ständiger Zugabe von flüssigem Stickstoff fein gemörsert und anschließend die Gesamt-RNA mit Hilfe des Purescript® RNA Isolation Kits (Gentra Systems, USA) nach Herstellerangaben extrahiert. Folgende Modifikationen wurden vorgenommen: Alle Zentrifugationschritte wurden bei 10.000 rpm (Zentrifuge 4K15C, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) durchgeführt. Der erste

Zentrifugationsschritt erfolgte für 8 min. Der anschließend in ein frisches Reaktionsgefäß überführte Überstand wurde weitere 6 min abzentrifugiert. Nach Zugabe von Isopropanol wurde 8 min und nach dem Waschen mit Ethanol nochmals 2 min zentrifugiert.

Das erhaltene Pellet wurde in 1,5 ml RNA-Hydrations-Lösung oder alternativ in DEPC-H₂O gelöst, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert. Die Qualität der Roh-RNA wurde mit einem 1,5%-igen denaturierendem Formaldehyd-Agarosegel (Kapitel 2.5.6.1) überprüft. Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte photometrisch (Kapitel 2.5.4).

2.5.2.2 DNaseI-Verdau

Um eventuell noch vorhandene DNA aus den RNA-Isolaten vollständig zu entfernen wurde ein DNaseI-Verdau nach folgendem Protokoll durchgeführt.

Bei diesem DNaseI-Verdau wurde das Enzym der Firma Roche in Kombination mit einem Puffersystem, nach Angaben von Sambrook et al. (1989) und den Protocols and Application Guide (Promega Corporation, 1996) zusammengestellt, verwendet. Für jede Probe wurden drei 200 µl Reaktionsansätze hergestellt. In diesen enthalten war je 148 µl Gesamt-RNA Suspension mit Konzentrationen zwischen 13-156 ng/µl, dementsprechend 0,5-2 µl DNaseI (10 U/µl), da insgesamt 1 Unit DNaseI/ µg Gesamt-Nukleinsäuren im Ansatz verwandt wurde. Weitere Komponenten im Ansatz waren 1× BSA, 50 mM Tris sowie 10 mM MgCl₂. Die Ansätze wurden kurz gevortext, anschließend 20 min bei 37°C inkubiert und bis zur Reinigung auf Eis gelagert.

2.5.2.3 RNA-Reinigung

Zur Entfernung von Enzym und Puffer sowie zur Aufkonzentrierung der RNA-Suspension wurde das RNeasy[®] Mini Kit (Qiagen, Hilden) benutzt. Die Aufreinigung basiert auf der selektiven Bindung an eine Silica-Membran. Die Reinigung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die drei 200 µl Reaktionsansätze jeder Probe wurden mit 700 µl des im Kit enthaltenen RLT Puffers und 500 µl Ethanol versetzt. Die einzelnen Zentrifugationsschritte wurden dann 6 × pro Probe durchgeführt, da das Volumen der RNeasy Mini Säulchen auf 700 µl begrenzt war. Alle 3 Reaktionsansätze jeder Probe aus dem DNaseI-Verdau wurden so auf einer Säule gebunden.

Zentrifugationszeiten und Umdrehungsgeschwindigkeiten wurden leicht geändert: Die ersten beiden Zentrifugationsschritte wurden für jeweils 1 min bei 10.000 rpm

durchgeführt, die letzten drei bei 17.000 rpm (Biofuge 17RS, Heraeus Sepatech GmbH, Osterode). Zur Eluation der RNA von der Säulen Matrix wurden nacheinander zweimal 15 µl DEPC-H₂O eingesetzt und die Eluate vereinigt.

Die Überprüfung der RNA-Qualität und die Konzentrationsbestimmung erfolgten wie unter Kap. 2.5.6.1 und 2.5.4 beschrieben. Die Lagerung der gereinigten RNA-Proben erfolgte bei -80°C.

2.5.3 cDNA-Synthese

2.5.3.1 Erststrangsynthese

Die cDNA-Synthese wurde mit dem SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech, Takahara Bio Company, Kanada) nach Herstellerangaben mit folgenden Modifikationen durchgeführt. Der Reaktionsansatz für die Erststrangsynthese der cDNA wurde halbiert und als Ausgangsmaterial wurden 125 ng RNA pro Probe genutzt. Nach einstündiger Inkubation bei 42°C wurden die Proben im Maßstab 1:5 mit TE_{0,1} verdünnt.

2.5.3.2 Zweitstrangsynthese

Die Long Distance PCR wurde mit dem Advantage™ 2 PCR Kit (Clontech, Takahara Bio Company, Kanada) nach Herstellerangaben durchgeführt. Für jede Probe wurden zwei 100 µl Reaktionsansätze angesetzt (PTC-200, MJ Research Inc., Waltham, USA) und jeweils 8 µl verdünnte Einzelstrang-cDNA genutzt.

Die Bedingungen für die Long Distance PCR waren wie folgt:

- 1 min 95°C
 - 15 sec Denaturierung bei 95°C
 - 30 sec Primeranlagerung bei 65°C
 - 6 min Primerverlängerung bei 68°C
 - 4°C Lagertemperatur
- } 20 Zyklen

2.5.3.3 cDNA-Reinigung

Die Reinigung der cDNA wurde wie folgt durchgeführt. Jeweils 25 µl der zwei cDNA-Ansätze pro Probe wurden gereinigt und anschließend 2,56 µl Proteinase K (15,6 mg/ml) zugegeben. Die Proben wurden zunächst 1 h bei 45°C, dann 10 min bei Raumtemperatur und zuletzt 9 min bei 90°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben zum Stoppen der Reaktion 2 min auf Eis gestellt.

Für die Ethanolfällung wurden zunächst 22 µl 5M NH₄Ac und anschließend 210 µl Ethanol (abs.) auf die Proben gegeben. Diese wurden 30 × invertiert und sofort 20 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet 10 min in einer Vakuumzentrifuge (SpeedVac, Jouan, Frankreich) getrocknet und anschließend in 20 µl H₂O_{bidest} resuspendiert.

Die cDNA wurde bis zur weiteren Nutzung bei -20°C gelagert. Die cDNA-Qualität wurde in einem Agarosegel überprüft (Kapitel 2.5.6.2) und die Konzentration der cDNA photometrisch erfasst (Kapitel 2.5.4).

2.5.4 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren wurde mit dem Gene Quant DNA/RNA Calculator (Amersham Biosciences, Freiburg) durchgeführt.

Die zu messenden Proben wurden mit H₂O_{bidest} bei DNA bzw. DEPC-H₂O bei RNA auf ein Volumen von 70 µl verdünnt. Der Verdünnungsmaßstab betrug bei RNA-Proben und genomischer DNA 1:10, bei cDNA 1:20. Die Proben wurden bei einer Extinktion von 260 nm und LOD_{260nm} = 1 bei 40 µg RNA/ml bzw. LOD_{260nm} = 1 bei 50 µg DNA/ml gemessen.

2.5.5 Markeranalysen

2.5.5.1 cDNA-AFLP-Marker

Die cDNA-AFLP-Analyse erfolgte nach Bachem et al. (1996) unter Verwendung des Enzymsystems *PstI/MseI*, adaptiert an das AFLP-Protokoll von Hartl et al. (1999). Alle Amplifikationen wurden in einem Mastercycler-Gradienten Thermocycler (Eppendorf) durchgeführt.

Die Restriktion und Ligation wurden in einem Reaktionsschritt durchgeführt. Die Reaktionslösung von 12,5 µl Volumen enthielt 300 ng ds-cDNA, 5 Units des Restriktionsenzym *PstI*, und 2,5 Units des Enzyms *MseI*, 2,5 pmol *PstI*-Adapter, 25 pmol *MseI*-Adapter, 1 Unit T4-Ligase, sowie 1mM ATP, 1× BSA und 1× NEB2-Puffer. Die Restriktions-/Ligationsansätze wurden im Thermocycler zunächst für 2 h bei 37°C inkubiert (gefolgt von weiteren 8 h bei 16°C). Anschließend wurden sie 1:4 mit H₂O_{bidest} (auf 50 µl) verdünnt.

Die Reaktionslösungen für die Präamplifikation hatten ein Volumen von 20 µl. In den Lösungen waren 250 ng der ligierten Restriktionsfragmente sowie je 0,3 µM der

entsprechenden *Pst*03- und *Mse*00-Primer, 0,2 μ M von jedem dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 0,25 Units Taq-Polymerase und 1 \times PCR Puffer.

Die PCR-Bedingungen für die Präamplifikation waren wie folgt:

- 2 min bei 72°C
 - 30 sec Denaturierung bei 94°C
 - 1 min Primeranlagerung bei 60°C
 - 2 min Primerverlängerung bei 72°C
 - 4°C Lagertemperatur
- } 20 Zyklen

Nach der Präamplifikation wurden 5 μ l des Ansatzes 1:40 mit TE_{0,1} verdünnt. Die selektive Amplifikation erfolgte in einem Gesamtvolumen von 10 μ l mit folgender Zusammensetzung: 150 ng des Präamplifikats, 0,3 μ M der entsprechenden *Pst*- bzw. *Mse*-Primer, 0,2 μ M von jedem dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 0,25 Units Taq-Polymerase und 1 \times PCR Puffer.

Die PCR-Bedingungen für die selektive Amplifikation waren wie folgt:

- 2 min bei 94°C
 - 30 sec Denaturierung bei 94°C
 - 30 sec Primeranlagerung bei 65°C (-1°C/Zyklus)
 - 2 min Primerverlängerung bei 72°C
 - 30 sec Denaturierung bei 94°C
 - 30 sec Primeranlagerung bei 56°C
 - 2 min Primerverlängerung bei 72°C
 - 4°C Lagertemperatur
- } 9 Zyklen
- } 23 Zyklen

Die Kartierungspopulation wurde mit insgesamt 36 *Pst*I/*Mse*I Primerkombinationen unter Verwendung der Standardliste für die AFLP-Primernomenklatur getestet (<http://wheat.pw.usda.gov/ggppages/keygeneAFLPs.html>). Die Bezeichnung der cDNA-AFLP-Marker setzte sich dabei aus den entsprechenden Primerkombinationen, gefolgt von der geschätzten Fragmentgröße, angegeben in Basenpaaren, zusammen. Die cDNA-AFLP-Marker sind mit dem Buchstaben c gekennzeichnet.

2.5.5.2 Genomische AFLP-Marker

Genomische Markerdaten der Alexis \times Steina Population standen aus vorhergehenden Arbeiten bereits zur Verfügung (Kipp 1998, Hartl et al. 2000). Die Markerdaten von 59

AFLP-Markern des Enzymsystems *EcoRI/MseI* wurden der Arbeit von A. Kipp (1998) entnommen.

Zusätzlich wurde die Population mit weiteren 20 Primerkombinationen des Enzymsystems *PstI/MseI* genotypisiert. Der Ablauf der Markeranalyse erfolgte hierbei wie unter Kap. 2.5.5.1 beschrieben. Die Bezeichnung der Primerkombinationen wurde ebenfalls der Standardliste für AFLP-Marker entnommen. Die genomischen AFLP-Marker sind in der Karte mit einem g gekennzeichnet.

2.5.5.3 SSR-Marker

Die Markerinformationen der Mikrosatelliten HVM 3, 4, 5, 14 und 68 wurden aus der ersten Kartierung der Alexis × Steina Population (Kipp 1998) übernommen. Weitere 200 Mikrosatelliten veröffentlicht von Becker und Heun (1995a), Liu et al. (1996), Russel et al. (1997), Struss und Plieske (1998), Ramsey et al. (2000), Thiel et al. (2003) und Li et al. (2003b) wurden auf Polymorphie zwischen den Kreuzungseltern getestet. Mit den polymorphen Mikrosatelliten wurden anschließend die DH-Linien genotypisiert. Die unveröffentlichten Primersequenzen für die GBM Mikrosatelliten wurden freundlicherweise vom Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung Gatersleben (IPK, <http://www.ipk-gatersleben.de>) zur Verfügung gestellt. Die GBM-Marker wurden unter folgenden PCR-Bedingungen amplifiziert. Die Reaktionslösungen hatten ein Volumen von 10 µl und enthielten 40 ng genomische DNA, je 0,5 µM Primer, 0,25 mM von jedem dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 0,25 Units Taq-Polymerase und 1× PCR Puffer.

Die PCR-Bedingungen waren folgendermaßen:

- 3 min Denaturierung bei 94°C
 - 1 min Denaturierung bei 94°C
 - 1 min Primeranlagerung bei 50°C, 55°C, 60°C
 - 1 min Primerverlängerung bei 72°C
 - 5 min Fragmentverlängerung bei 72°C
 - 4°C Lagertemperatur
- } 40 Zyklen

Die veröffentlichten Mikrosatelliten wurden wie in der Datenbank des UK Crop Plant Bioinformatics Network (<http://www.ukcrop.net>) oder in den entsprechenden Publikationen beschrieben gehandhabt.

Die Primer waren entweder am 5'-Ende mit Fluorescein markiert oder die Gele wurden, bei Verwendung von unmarkierten Primern, nach elektrophoretischer Trennung der Fragmente mit Vista Green (Amersham, Braunschweig) angefärbt. Nach der PCR wurden den Reaktionen 10 µl Loading Dye zugegeben und diese anschließend denaturiert.

2.5.5.4 SNP-Marker

Die Einzel-Nukleotid-Polymorphismen (SNP)-Analyse erfolgte mittels Pyrosequenzierung (<http://www.biotagebio.com>). Das Prinzip der Methode besteht aus einer Enzym-Substrat-Reaktion, bei der Luziferin unter ATP-Verbrauch zu Oxiluciferin umgewandelt wird, wobei ein detektierbares Lichtsignal entsteht. Die Reaktion beginnt mit der Bindung eines Sequenzierprimers an ein einzelsträngiges PCR-Produkt und dem Einbau von komplementären Nukleotiden mittels DNA-Polymerase. Da die Nukleotide in Form von Desoxynukleosid-Triphosphaten vorliegen, entsteht beim Einbau dieser Pyrophosphat, welches mit Adeninphosphosulfat durch eine Sulfurylase zu ATP umgewandelt wird. ATP liefert der Luciferase die Energie zur Oxidierung von Luciferin zu Oxyluciferin. Dieses produziert ein Lichtsignal, dessen Intensität von der ATP-Menge und somit von der Menge der eingebauten Nukleotide abhängig ist. Das Lichtsignal wird mit einer CCD (Charge-coupled Device)-Kamera detektiert und in einem Pyrogramm dargestellt. Die Nukleotide werden dem Reaktionsansatz nacheinander in einer durch die Sequenz bestimmten Reihenfolge zugegeben. Im Anschluss an die Reaktionen werden nicht eingebaute Nukleotide durch eine Apyrase abgebaut, so dass das Lichtsignal proportional zur eingebauten Menge eines Nukleotids ist.

Vor der Enzym-Substrat-Reaktion muss zunächst eine PCR mit einem Biotinmarkierten Primer durchgeführt werden. Diese Markierung sorgt dafür, dass das PCR-Produkt leicht denaturiert, gereinigt und der Pyrosequenzierung zugeführt werden kann. Der einzelne Reaktionsansatz für die PCR setzte sich, bei einem Gesamtvolumen von 50 µl wie folgt zusammen: 20 ng genomische DNA, je 0,2 µM Primer, 0,2 mM von jedem dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 Units Hot Start Taq-Polymerase sowie 1× High Performance PCR Puffer. Für die PCR wurde eine Hot Start Taq-Polymerase mit den entsprechenden Chemikalien benutzt, um möglichst ein einzelnes klares Zielfragment zu erhalten.

Die PCR-Bedingungen waren wie folgt:

- 10 min Denaturierung bei 94°C
 - 30 sec Denaturierung bei 94°C
 - 30 sec Primeranlagerung bei 60°C (-0,5°C/Zyklus)
 - 1 min Primerverlängerung bei 72°C
 - 30 sec Denaturierung bei 94°C
 - 30 sec Primeranlagerung bei 55°C
 - 1 min Primerverlängerung bei 72°C
 - 3 min Fragmentverlängerung bei 72°C
 - 4°C Lagertemperatur
- } 10 Zyklen
- } 35 Zyklen

Die Sequenzen der in dieser Arbeit getesteten SNP-Marker (GBS) wurden freundlicherweise vom IPK Gatersleben (<http://www.ipk-gatersleben.de>) zur Verfügung gestellt (Kota et al. 2007). Es wurden 40 SNP-Marker auf Polymorphie zwischen den Kreuzungseltern getestet. Mit Hilfe der Software PSQ Assay Design 1.0 (Biotage, Schweden) wurden die PCR-Primer (entweder der Forward- oder Reverse-Primer biotinyliert) und der Sequenzierprimer abgeleitet. Außerdem wurde die Population mit einem SNP-Marker, der auf einem Basenaustausch in der Sequenz des *Alpha-Amylase I* Gens (*amy1*) beruht, genotypisiert. Dieser Marker wurde von I. Matthies am IPK entwickelt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt (Matthies et al. 2009). Der Erfolg der PCR wurde in einem 2%-igen Agarosegel (Kapitel 2.5.6.2) kontrolliert.

Für die anschließende Pyrosequenzierung wurde das Pyro Gold Reagents Kit (Biotage, Uppsala, Schweden) und das PSQ 96MA 2.1 (Biotage, Schweden) System verwendet. Zunächst wurde mit der Pyrosequenzierungs Software ein Versuchsaufbau erstellt. Aus der zu untersuchenden Sequenz und der Anzahl der Proben berechnete die Software die benötigte Menge an Nukleotiden, Enzymen und Substrat.

Die folgenden Schritte dienen der Aufreinigung der PCR-Produkte. 40 µl des PCR-Produkts wurden für die SNP-Analyse in einer 96-well Platte mit 37 µl Binding Puffer und 3 µl Sepharose Dyna-Beads gemischt und für 15 min geschüttelt. Dies diente der Anlagerung der Sepharose Beads an den biotinylierten Primer/ DNA-Strang. Mit einer speziellen Matrix (PSQ Sample Prep Tool) und einer daran angeschlossenen Vakuumpumpe wurden die Beads mit den daran angelagerten PCR-Fragmenten aufgesaugt und für 5 sec in eine Platte mit 70%igem Ethanol transferiert. Die Denaturierung der PCR-Produkte erfolgte in einer Denaturierungslösung mit 0,2 M NaOH, ebenfalls für 5 sec. Anschließend wurde der an die Beads gekoppelte DNA-

Einzelstrang auf gleiche Weise zum Waschen in eine Platte mit Waschpuffer überführt. Schließlich erfolgte in einer weiteren Platte die Hybridisierung des biotinylierten DNA-Stranges mit 1,8 µl des Sequenzierprimers (10 µM) in 38,8 µl Annealing Puffer für 2 min bei 80°C. Der Sequenzierprimer bindet direkt vor dem SNP an die DNA. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde diese Platte in den Pyrosequenzierer eingesetzt. Enzym und Substrat des SNP Reagent Kits wurden gleichermaßen in je 620 µl Wasser gelöst und zusammen mit der jeweilig vom Programm vorgegebenen Menge der Desoxynukleosid-Triphosphate in die vorgegebene Kartusche des Pyrosequenzierungs-Automaten gefüllt. Während des Laufs wurden der Sequenzierreaktion automatisch zunächst Enzym und Substrat und anschließend die Nukleotide in vorgegebener Reihenfolge zugegeben. Nach Beendigung des Programms wurden die Ergebnisse des jeweiligen Laufs angezeigt und konnten ausgewertet werden.

2.5.6 Gelelektrophoretische Methoden

2.5.6.1 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von RNA

Die elektrophoretische Auftrennung von RNA erfolgte unter denaturierenden Bedingungen, um die Ausbildung von Sekundärstrukturen, die das Laufverhalten der RNA-Moleküle negativ beeinflussen würden, zu vermeiden. Für die Gelelektrophorese wurden 1,5%-ige Agarosegele mit Zusatz von 17,7% Formaldehyd eingesetzt. Die Zusammensetzung der verschiedenen Puffer und Reagentien ist im Anhang beschrieben. Agarose und DEPC-H₂O wurden vereinigt, anschließend nach Abkühlung des Gels 5 × RNA-Elektrophoresepuffer und Formaldehyd hinzugegeben und das Gel gegossen. Der RNA-Beladungspuffer wurde als Mastermix angesetzt und 4 µl Probe mit 15,5 µl dieses Puffers versetzt. Der Ansatz wurde anschließend 5 min bei 55°C im Thermocycler (PTC-200, MJ Research Inc., Waltham, USA) denaturiert und danach für 2 min auf Eis inkubiert. Das Gel wurde für 30 min bei 60 V in Vorlauf gegeben und dann mit den Proben beladen. Der Gellauf erfolgte in 1 × RNA-Elektrophoresepuffer zuerst für 10 min bei 100 V und anschließend 1 h bei 70 V in einer horizontalen Elektrophoresekammer (PEQLAB-Biotechnologie GmbH, Erlangen).

2.5.6.2 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration, zur Auftrennung bestimmter PCR-Marker und zur Überprüfung der cDNA-Qualität wurden Gele aus Agarose und TBE-Puffer hergestellt.

Die Agarosekonzentration wurde je nach Fragmentgröße zwischen 0,8% und 2% variiert. Der Gellauf erfolgte in $1 \times$ TBE Puffer in einer horizontalen Elektrophoresekammer (PEQLAB-Biotechnologie GmbH, Erlangen) bei 80 V für 2 h.

Als Größenmarker wurde der Smart Ladder (bei Fragmenten ab 400 bp, Eurogentec, Belgien) oder Smart Ladder SF (bei Fragmenten kleiner als 400 bp, Eurogentec, Belgien) eingesetzt. Vor dem Gelauftrag wurden die Proben mit 10 μ l Loading Dye versetzt.

2.5.6.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Alle amplifizierten Fragmente aus der AFLP- und Mikrosatellitenanalyse wurden auf einem 5%-igem denaturierendem Polyacrylamidgel elektrophoretisch nach Basenpaaranzahl aufgetrennt. Die Proben wurden mit 10 μ l Loading Dye versetzt und die Fragmenttrennung erfolgte in einer vertikalen Elektrophoresekammer (SS-32, Biometra) bei einer angelegten Spannung von 1580 V bei 50 Watt für 1,5-2 h.

Die Bestimmung der Fragmentgröße wurde über einen auf den Gelen mitlaufenden Längenstandard (Laboreigener Standard) ermittelt. DNA-Amplifikate ohne Einsatz von fluoreszierenden Primern wurden kurz vor dem Scannen mit „Vistra GreenTM“ (Konzentration=1/ 10.000) angefärbt.

2.5.7 Detektion und Fragmentanalyse

Die Detektion der im Gel aufgetrennten DNA- bzw. RNA-Moleküle erfolgte mittels eines Typhoon 9200 Fluoreszenz-Scanners (Amersham Bioscience, Freiburg).

Die digitalen Bilder der Mikrosatelliten und STS-Marker wurden visuell ausgewertet. Die Auswertung der genomischen und der cDNA-AFLP-Marker erfolgte mit Hilfe des Programms Cross Checker (Buntjer et al. 2000) und wurde anschließend visuell überprüft.

2.6 Datenauswertung

2.6.1 Statistische Auswertung der phänotypischen Daten

Die statistische Auswertung der phänotypischen Daten wurde mit dem Programm SAS Version 9.1 (SAS Institute 2004) durchgeführt. Zunächst wurde mit der Prozedur PROC UNIVARIATE eine Überprüfung der phänotypischen Daten auf Normalverteilung vorgenommen. Diese Prozedur ermittelt außerdem die statistischen Daten für Mittelwerte, Standardabweichung, Summenquadrate, Varianz, Schiefe und Wölbung, Variationskoeffizienten, Standardfehler des Mittelwerts, Minimum und Maximumwerte sowie die Quantile.

Um den Grad des linearen Zusammenhangs verschiedener Merkmale oder derselben Merkmale in verschiedenen Umwelten zu untersuchen, wurde eine Korrelationsanalyse nach Pearson mit der Option PROC CORR durchgeführt. Basierend auf den phänotypischen Daten der agronomischen Merkmale der einzelnen Umwelten wurde eine nichtparametrische Varianzanalyse mit der Prozedur PROC NPAR1WAY durchgeführt.

Die Heritabilität im weiteren Sinne wurde nach Fehr (1987) mit 95%-igen Konfidenzintervallen (Knapp und Bridges 1987) mit dem Programm PLABSTAT Version 2P (Utz 2001) berechnet.

Für die Merkmale der Malzqualität wurden keine Varianzanalyse und keine Untersuchung der Heritabilität durchgeführt, da für die einzelnen Umwelten keine Wiederholungen vorlagen und so eine exakte Bestimmung dieser statistischen Größen nicht möglich war.

2.6.2 Molekulargenetische Kartierung

Für DH-Linien innerhalb einer Population wird eine Spaltung der Marker im Verhältnis 1:1 erwartet. Alle Marker wurden mittels Chi-Quadrat Test auf eine gestörte Spaltung überprüft.

Die molekulargenetische Kartierung der Marker wurde mit dem Programm JoinMap 3.0 (Van Ooijen und Voorrips 2001) durchgeführt. Für die Gruppierung der Marker wurde ein $LOD \geq 3$ und eine maximale genetische Distanz von 30 cM festgelegt. Die Verrechnung erfolgte unter Verwendung der Haldane Funktion (Haldane 1919). Die Zuordnung der Kopplungsgruppen zu den Chromosomen erfolgte mittels

Mikrosatelliten. Die Orientierung der Kopplungsgruppen wurde anhand veröffentlichter Chromosomenkarten festgelegt.

2.6.3 QTL-Analysen

Die QTL-Analysen wurden mit dem Programm MultiQTL Version 2.5 (Korol et al. 2005) durchgeführt. Dabei wurden sowohl die Mittelwerte über alle Umwelten als auch die phänotypischen Daten der einzelnen Umwelten verwendet. Für die Verrechnung der einzelnen Umwelten wurde die MULTIPLE ENVIRONMENT OPTION genutzt. Diese führt eine Analyse über die Umwelten durch, wodurch die Aussagekraft der QTL-Analyse erhöht wird. Durchgeführt wurden sowohl ein Simple Intervall Mapping (SIM) als auch ein Multiple Intervall Mapping (MIM). Letzterer Algorithmus reduziert die Variation im genetischen Hintergrund, indem es QTL-Effekte anderer Chromosomen berücksichtigt. Mittels Permutationstests (Churchill und Doerge, 1994) wurden die LOD-Schwellenwerte festgelegt, bei denen ein QTL als signifikant angenommen wurde. Das Multiple Intervall Mapping wurde unter Ausschluss nicht signifikanter QTL so oft durchgeführt, bis nur noch zu mindestens 99,9% signifikante QTL übrig waren.

2.7 QTL-basierte Fragmentanalyse

2.7.1 Fragmentisolation

Basierend auf der Kartierung und der QTL-Analysen wurden die Transkriptommarker, die enge Kopplungen zu den quantitativen Effekten zeigten, isoliert, kloniert und sequenziert, mit dem Ziel Kandidatengene für Malzqualität zu identifizieren und aus diesen Fragmenten funktionelle genomische Marker für Malzqualität zu entwickeln.

Um cDNA-AFLP-Fragmente aus dem Gel zu isolieren wurden diese in einem 5%-igen PAA-Gel aufgetrennt, das Fragment durch einen 1:1 Ausdruck des Typhoon-Scanners in seiner Gelposition markiert, mittels Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und für die Eluation der cDNA-Fragmente in 50 µl H₂O_{bidest} (MilliQ) gegeben. Nach einer über Nacht Inkubation wurden die Eluate 1 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert und in einer PCR mit Adapter-spezifischen AFLP-Primern reamplifiziert. Für jedes Fragment wurden zwei 60 µl Ansätze mit folgender Zusammensetzung hergestellt: 0,5 µl des Eluats, je 0,2 µM des preselektiven Primers P03 und des selektiven Mse-Primers, 0,2

mM von jedem dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 0,25 Units Taq-Polymerase und 1 × PCR Puffer. Das PCR-Programm war identisch mit dem der selektiven Amplifikation (Kapitel 2.5.5.1).

Die erhaltenen PCR-Fragmente wurden mittels QIAquick[®]PCR-Purification Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben aufgereinigt und die Konzentration photometrisch erfasst (Kapitel 2.5.4).

2.7.2 Klonierung von cDNA-AFLP-Fragmenten

Ligation und Transformation wurden mit dem Qiagen[®] PCR Cloning^{Plus} Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die Klonierung wurde der pDrive Cloning Vektor (50 ng/μl), ein T/A Klonierungsvektor, benutzt. Die gereinigten PCR-Fragmente (34 ng/ μl) wurden mit Vektor DNA ligiert und in kompetente E. coli Zellen transformiert. Dem Transformationsansatz wurden 125 μl Soc-Medium (Qiagen, Hilden) zugegeben. Der Ansatz wurde anschließend in drei verschiedenen Volumina (20, 50, 80 μl) ausplattiert. Zur Identifizierung inserthaltiger Transformanden wurden die Bakterienkolonien, neben der Selektion auf Ampicillinresistenz, parallel einer Blau-Weiß Selektion unterzogen. Die Bakterienzellen wurden dazu auf LB_{Amp}-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Rekombinante Bakterienkolonien, die die Fremd-DNA integriert hatten, zeigten weiße Kolonien und wurden mit einem Zahnstocher gepickt, in 10 μl MilliQ-Wasser überführt und mit Hilfe des Ori Master Kits (Eppendorf, Hamburg) einer PCR nach Herstellerangaben unterzogen. Zur Überprüfung der Insertion wurde ein *EcoRI*-Verdau der PCR-Fragmente für 3 h bei 37°C durchgeführt und auf einem 2%-igem Agarosegel aufgetrennt. Der Reaktionsansatz für den *EcoRI*-Verdau hatte ein Volumen von 20 μl und setzte sich wie folgt zusammen: 4,0 μl PCR-Produkt, 5 Units des *EcoRI*-Restriktionsenzym, sowie 1× NEB Puffer *EcoRI*.

Problematisch bei der Sequenzgewinnung ist, dass jede Bande aus nur einem oder aus mehreren Genfragmenten bestehen kann. In dieser Arbeit wurden für jede der ausgeschnittenen Banden mindestens drei Klone der Reamplifikation sequenziert, um falsche Sequenzen auszuschließen.

2.7.3 DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse

Die DNA-Sequenzierung der Plasmide erfolgte nach der Sanger-Methode und wurde bei der Firma MWG Biotech GmbH (<http://www.mwg-biotech.com>) durchgeführt. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit dem Softwarepaket Vektor NTI AdvanceTM 10.3 (Invitrogen, Carlsbad, Canada) analysiert und die Nukleotidsequenzen mit der Software BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, Altschul et al., 1990) gegen die Gendatenbanken NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) und TIGR (The Institute for Genomic Research, <http://www.tigr.org>) auf Ähnlichkeiten mit bereits bekannten Sequenzen überprüft.

2.8 Ableitung genomischer Marker aus Expressionsmarkern

Neben Expressionsunterschieden als Ursache für einen Polymorphismus besteht in der cDNA-AFLP-Prozedur auch die Möglichkeit, Polymorphismen, die auf Sequenzunterschieden innerhalb der Restriktionsschnittstellen oder Primerbindungsstellen beruhen, zu detektieren. Zur Aufklärung der Polymorphismen und mit dem Ziel der Entwicklung funktioneller Marker wurden Alignments von sequenzierten TDFs mit annotierten ESTs, die bei der BLAST-Abfrage hohe Homologien mit den entsprechenden TDFs zeigten, durchgeführt.

Wenn die EST-Sequenzen die TDFs über die Schnittstellen hinaus verlängerten, konnten PCR-Primer, welche die Schnittstellen umschlossen, aus den EST-Sequenzen abgeleitet werden. Nach der PCR-Analyse mit diesen Primern erfolgte ein Verdau mit den entsprechenden AFLP-Restriktionsenzymen, um den möglichen Polymorphismus in der Schnittstelle zu detektieren.

Die Alignments der TDFs und der EST-Sequenzen wurden mit dem Programm Vektor NTI durchgeführt. Die Primer wurden nach folgender Formel konstruiert:

$$T_m = \text{Anzahl (A+T)} \times 2 \text{ (}^\circ\text{C)} + \text{Anzahl (G+C)} \times 4 \text{ (}^\circ\text{C)}.$$

Folgende Bedingungen sollten erfüllt sein:

- Schmelztemperatur zwischen 50°C und 60°C
- Primer zwischen 18 und 22 bp lang
- am 3' Ende kein C
- GC-Gehalt bei ca. 50%

- Schmelztemperaturunterschied zwischen Forward- und Reverse- Primer nicht mehr als 2°C

Die Primer wurden in einer standardisierten PCR mit Temperaturgradient zwischen 45°C und 60°C mit der genomischen DNA der Kreuzungseltern getestet. Der PCR-Ansatz hatte ein Volumen von 20 µl und entsprach im Wesentlichen dem oben genannten für die SSR-Analyse. Ergaben sich eindeutige DNA-Fragmente wurden diese mit den entsprechenden AFLP-Restriktionsenzymen verdaut (Kapitel 2.5.5.1). Konnte ein Polymorphismus zwischen den Eltern detektiert werden, wurde die Population mit diesem genotypisiert und der Marker in die Kopplungskarte rückkartiert.

Die PCR-Bedingungen für die Gradienten-PCR waren wie folgt:

- 3 min Denaturierung bei 94°C
 - 30 sec Denaturierung bei 94°C
 - 30 sec Primerverlängerung bei 52°C +/-7°C
 - 1 min Primeranlagerung bei 72°C
 - 3 min Fragmentverlängerung bei 72°C
 - 4°C Lagertemperatur
- } 40 Zyklen

Bei Fragmenten, für die mit dieser Methode kein Polymorphismus zwischen den Eltern detektiert werden konnte, wurde mit homologen ESTs, deren Sequenz länger war als die Ihrige ein Alignment durchgeführt. So bestand die Möglichkeit, außerhalb der ursprünglichen Sequenz liegende Primerpaare abzuleiten und möglichst große Fragmente zu generieren. Dies erhöhte die Chance auf eine SNP-Detektion. Primerentwicklung und Gradienten-PCR wurden, wie oben beschrieben, durchgeführt.

Konnten klar definierte Fragmente auf dem Agarosegel identifiziert werden, wurde eine PCR im präparativen Maßstab für die Direktsequenzierung der PCR-Produkte mit den Kreuzungseltern Alexis und Steina durchgeführt (Kapitel 2.7.1). Im Unterschied zur präparativen PCR in Vorbereitung auf die Klonierung wurden 0,15 mM anstatt 0,2 mM Primer verwendet. Die Reinigung der PCR-Produkte und die Konzentrationsmessung wurden wie unter Kapitel 2.7.1 und 2.5.4 beschrieben durchgeführt.

Die DNA-Sequenzierung der PCR-Produkte erfolgte bei der Firma MWG Biotech GmbH. Die Fragmente wurden von beiden Seiten mit den entsprechenden Primern mehrfach sequenziert. Für SNPs zwischen den Kreuzungseltern wurden mit dem

Programm PSQ Assay Design Primer für die Pyrosequenzierungs-Analyse generiert. Der Ablauf der Pyrosequenzierung geschah wie unter Kapitel 2.5.5.4 beschrieben.

Zur Validierung der abgeleiteten genomischen Marker wurden diese auf einem Sortiment von 40 Sommergerstensorten getestet. Es lagen Malzqualitätsdaten aus vier Umwelten (Wohlde 2004, 2005, 2006, Freising 2005) für diese Sorten vor. Um mögliche Selektionseffekte der abgeleiteten Marker auf die Malzqualität der Sorten zu detektieren wurde mit den selektierten Sorten ein multipler Mittelwertvergleich nach Scheffe mit dem Programm SAS Version 9.1 (SAS Institute 2004) durchgeführt. Eine Liste der Sorten mit genauen Abstammungsdaten befindet sich im Anhang (Tabelle A1).

3 Ergebnisse

3.1 Analyse der Malzqualität

Die Auswertung der einzelnen Malzqualitätsparameter basierte, mit Ausnahme der Parameter VZ45°C und Alpha-Amylaseaktivität, auf Daten aus acht Umwelten. Für die VZ45°C lagen Daten aus sieben Umwelten vor, die Alpha-Amylaseaktivität wurde in nur einer Umwelt erhoben, um einen ersten Einblick zu bekommen, inwieweit dieses Merkmal in der vorliegenden Population spaltet und, inwieweit die erhobenen Daten mit dem kartierten Kandidatengen für Alpha-Amylase assoziiert sind. Tabelle 4 gibt einen kurzen Überblick über die Mittelwerte der Populationseltern sowie den Minima, Maxima und den Mittelwerten der Population.

Tabelle 4: Kenngrößen der Population und der Kreuzungseltern für die erfassten Malzqualitätsmerkmale. Die Daten basieren auf den Mittelwerten über die Umwelten.

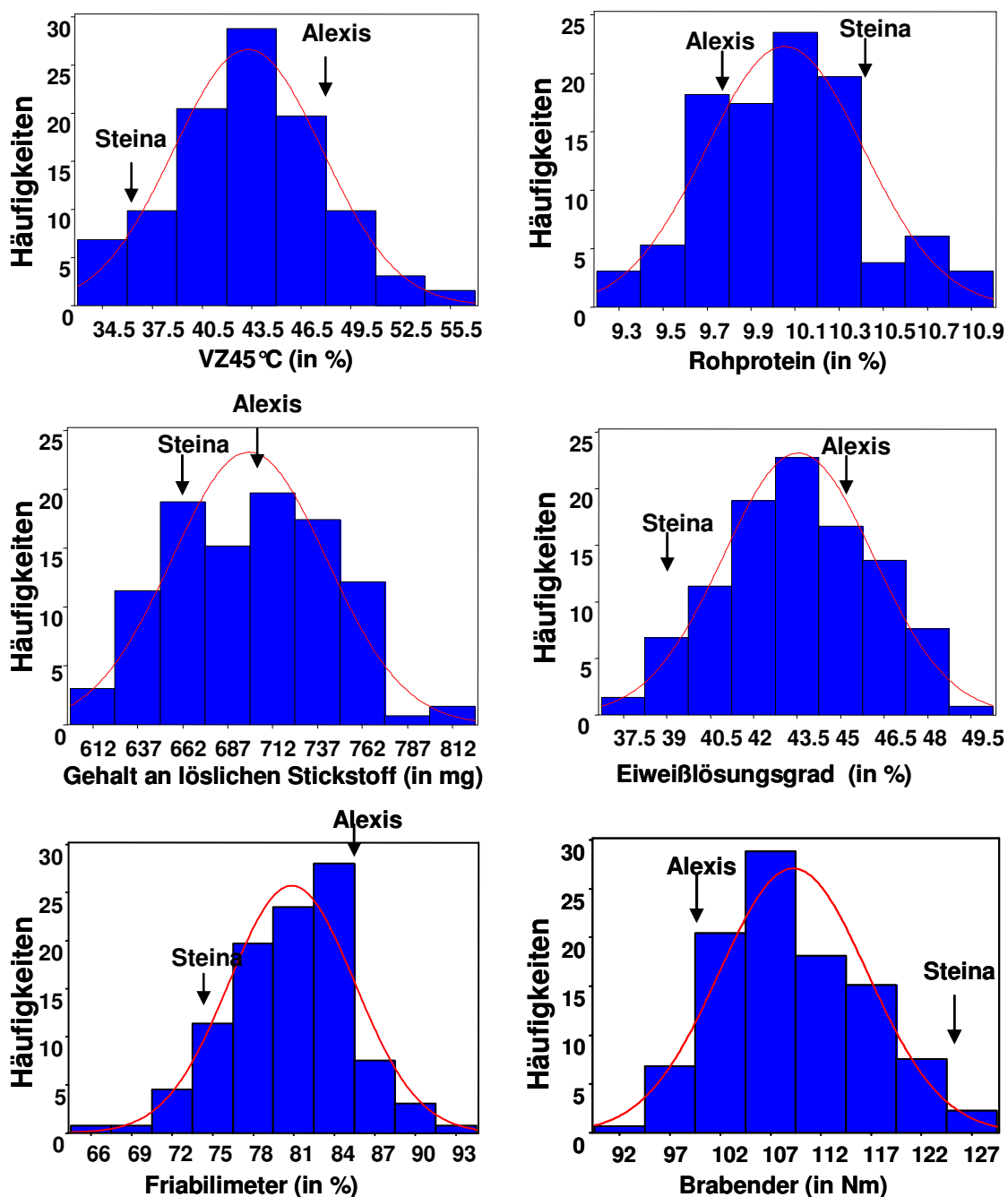
Merkmal	Alexis	Steina	Eltern- mittel	Populations- mittel	Min.	Max.
VZ	46,9	35,8	41,4	43,3	33,5	55,5
RP	9,8	10,4	10,1	10,1	9,2	10,9
LN	700	663	682	699	607	811
ELG	44,9	39,9	42,4	43,5	37,1	49,6
FRI	85,6	74,3	80,0	80,9	67,1	93,1
BRA	101	126	114	110	91	129
VIS	1,50	1,55	1,53	1,51	1,45	1,60
EX	82,2	81,6	81,9	82,0	79,9	84,0
EV	83,4	81,4	82,4	82,7	80,6	84,4
AA	48,0	38,0	43,0	42,0	25,0	59,0
MQI	8,4	6,5	7,5	7,7	5,6	9,3

Abkürzungen: VZ: VZ45°C (%); RP: Rohproteingehalt (%); LN: Gehalt an löslichem Stickstoff (mg); ELG: Eiweißlösungsgrad (%); VIS: Viskosität (mPas); BRA: Brabender (Nm); FRI: Friabilimeter (%); EX: Extraktgehalt (%); EV: Endvergärungsgrad (%); MQI: Malzqualitätsindex; AA: Alpha-Amylaseaktivität (DBE: Dextrinbildungseinheiten).

Der Mittelwert der DH-Population lag für den Rohproteingehalt, den MQI, die Parameter der cytolytischen Lösungsfähigkeit (Brabender, Friabilimeter) mit Ausnahme der Viskosität und die der amylolytischen Lösungsfähigkeit (Extrakt, Endvergärung, Alpha-Amylaseaktivität), nahe dem Elternmittel. Dagegen war das Populationsmittel

für die VZ45°C und die proteolytischen Parameter (Eiweißlösungsgrad, Gehalt an löslichem Stickstoff) sehr nahe beim besseren Elter Alexis. Dies sind auch die Merkmale, in denen die Elternmittelwerte die größten Unterschiede zeigten. Transgressionen traten bei allen Merkmalen sowohl in die qualitativ schlechtere als auch in die qualitativ bessere Richtung auf. Insgesamt lag die Malzqualität in dieser Population auf einem hohen Niveau.

Die Verteilungen der Populationsmittelwerte für die einzelnen Malzqualitätsparameter sind in Abbildung 6 dargestellt. Alle Verteilungen waren einer Normalverteilung angepasst und zeigten keine signifikanten Abweichungen.



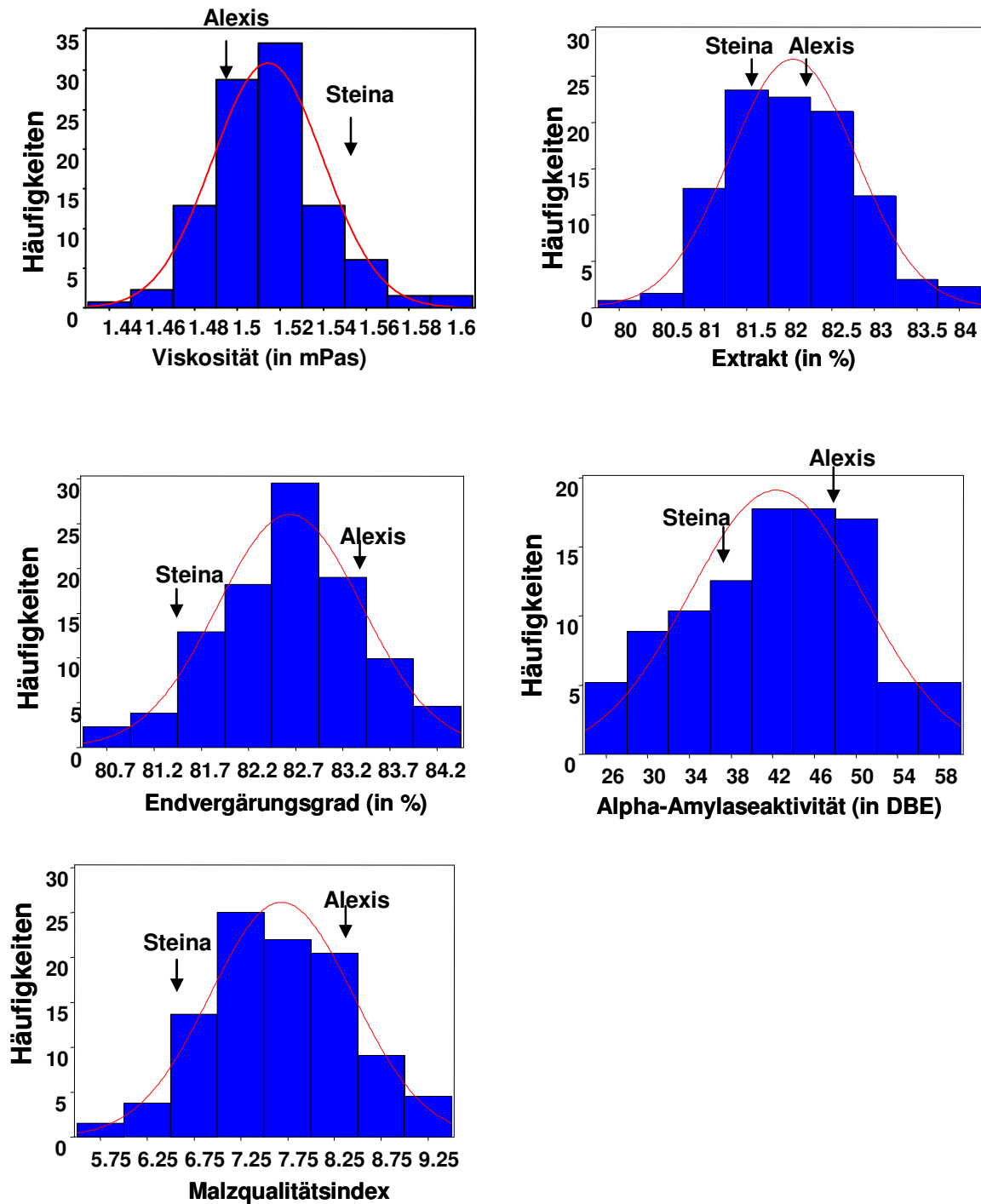


Abbildung 6: Häufigkeitsverteilungen der 132 DH-Linien der Kartierungspopulation für die Mittelwerte der einzelnen Malzqualitätsparameter über die jeweiligen Umwelten. Die Mittelwerte der Eltern sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Die Korrelationskoeffizienten zwischen den einzelnen Umwelten für alle Merkmale sind in Tabelle A2 im Anhang aufgelistet. Für die VZ45°C ergaben sich hohe Korrelationen zwischen 0,43 ($p < 0,01$) und 0,78 ($p < 0,01$). Die Korrelationskoeffizienten zwischen den Umwelten für den Rohproteingehalt bewegten sich

zwischen 0,02 und 0,62 ($p < 0,01$). Insgesamt konnten relativ große Schwankungen in den Korrelationen der Umwelten für den Rohproteingehalt beobachtet werden. Da jedoch keine Umwelt systematisch einen sehr schlechten Zusammenhang ergab, wurden alle Umwelten in die weiteren Analysen mit einbezogen. Für den Gehalt an löslichem Stickstoff lagen die Korrelationen zwischen 0,28 ($p < 0,01$) und 0,68 ($p < 0,01$). Auch beim Eiweißlösungsgrad zeigten alle Korrelationen (0,28-0,64, $p < 0,01$) hochsignifikante Einstufungen. Die Umweltkorrelationen für den Friabilimeter bewegten sich zwischen 0,12 und 0,59 ($p < 0,01$). Insgesamt zeigte sich eine große Schwankungsbreite der Korrelationskoeffizienten, welche auf große Umwelteinflüsse bei diesem Merkmal hinweisen. Die Korrelationskoeffizienten zwischen den Umwelten für den Brabender reichten von nicht signifikant (0,03) bis hochsignifikant (0,61, $p < 0,01$). Vor allem der Standort Freising 2005 war mit keiner weiteren Umwelt korreliert. Bei der Viskosität lagen die Korrelationskoeffizienten zwischen 0,02 und 0,52 ($p < 0,01$). Die Werte für die Viskosität des Materials aus der Umwelt Freising 1996 waren mit vier der sieben anderen Umwelten nicht signifikant korreliert. Mit Ausnahme der Umwelten Freising 1994 und 1996, die nicht signifikant korreliert waren, zeigten alle anderen Umweltpaarungen für den Extraktgehalt hochsignifikante Korrelationen zwischen 0,33 ($p < 0,01$) und 0,63 ($p < 0,01$). Die großen Schwankungen in den Korrelationskoeffizienten beim Endvergärungsgrad, die zwischen 0,02 und 0,53 ($p < 0,01$) lagen, deuten auch bei diesem Merkmal auf einen hohen Umwelteinfluss hin. Die Korrelationskoeffizienten zwischen den Umwelten für den MQI waren relativ stabil und lagen mit Werten zwischen 0,27 ($p < 0,05$) und 0,62 ($p < 0,01$) im signifikanten bis hochsignifikanten Bereich.

In Tabelle 5 sind die Korrelationen zwischen den einzelnen Parametern der Malzqualität dargestellt. Für die Verrechnung wurden die Daten über die Umwelten gemittelt. Die Malzqualitätsparameter waren alle, bis auf Ausnahme des Extraktes und der Viskosität, signifikant bis hoch signifikant miteinander korreliert. Hohe Korrelationen zeigten die proteolytischen Merkmale Gehalt an löslichem Stickstoff und Eiweißlösungsgrad untereinander und mit der VZ45°C. Rohproteingehalt, Brabender und Viskosität waren untereinander positiv und mit den restlichen Malzqualitätsparametern negativ korreliert. Insbesondere der Brabender zeigte sehr hohe negative Korrelationen zu den restlichen

Parametern. Der MQI war sehr eng mit den ihn bestimmenden Parametern VZ45°C, Friabilimeter, Extrakt und Endvergärung korreliert. Die größte Korrelation zum MQI hatte aber der Brabenderwert, obwohl er rechnerisch nicht direkt mit einbezogen wurde.

Tabelle 5: Korrelationen zwischen den Malzqualitätsparametern. Die Daten basieren auf den Mittelwerten über die Umwelten. Abkürzungen siehe Tabelle 4.

	VZ	RP	LN	ELG	VIS	BRA	FRI	EX	EV	MQI
VZ	1									
RP	-0,20*	1								
LN	0,64**	0,34**	1							
ELG	0,77**	-0,24**	0,83**	1						
VIS	-0,59**	0,22**	-0,39**	-0,52**	1					
BRA	-0,52**	0,44**	-0,33**	-0,60**	0,56**	1				
FRI	0,47**	-0,61**	0,21*	0,58**	-0,64**	-0,84**	1			
EX	0,33**	-0,18*	0,36**	0,49**	-0,05	-0,59**	0,36**	1		
EV	0,64**	-0,40**	0,19*	0,42**	-0,65**	-0,57**	0,58**	0,20*	1	
MQI	0,76**	-0,49**	0,39**	0,69**	-0,52**	-0,83**	0,76**	0,73**	0,71**	1

* und ** Signifikant bei $p \leq 0,05$ bzw. $p \leq 0,01$.

3.1.1 Alpha-Amylaseaktivität

Die Alpha-Amylaseaktivität wurde nur in der Umwelt Freising 2006 erhoben. Das Merkmal differenzierte zwischen den Populationseltern und zeigte eine quantitative Verteilung innerhalb der Population, die an eine Normalverteilung angepasst war (Abbildung 6).

Die Alpha-Amylaseaktivität wurde mit den Werten der anderen Malzqualitätsparameter des Standortes Freising 2006 korreliert (Tabelle 6). Für die VZ45°C, bei der keine Daten dieses Standortes vorlagen, wurde der Mittelwert über alle sieben Umwelten verwendet. Es ergaben sich sehr hohe Korrelationen zwischen der Alpha-Amylaseaktivität und der VZ45° sowie dem Endergärungsgrad. Auch mit den Merkmalen Gehalt an löslichem Stickstoff, Eiweißlösungsgrad, Friabilimeter und Malzqualitätsindex war die Alpha-Amylaseaktivität hochsignifikant bis signifikant positiv korreliert. Hochsignifikante negative Korrelationen ergaben sich mit der Viskosität und dem Brabender.

Tabelle 6: Korrelationen zwischen der Alpha-Amylaseaktivität und den anderen Malzqualitätsparametern für die Umwelt Freising 2006. Abkürzungen siehe Tabelle 4.

	VZ	RP	LN	ELG	VIS	BRA	FRI	EX	EV	MQI
AA	0,71**	-0,15	0,53**	0,54**	-0,61**	-0,50**	0,52**	0,13	0,68**	0,60**

* und ** Signifikant bei $p \leq 0,05$ bzw. $p \leq 0,01$.

3.2 Analyse der agronomischen Merkmale

Die Kreuzungseltern Alexis und Steina zeigten bei den agronomischen Daten nur für die Wuchshöhe eine deutliche Differenzierung, wobei der Mittelwert der Population in etwa dem Elternmittel entsprach (Tabelle 7). Die Elternwerte für die übrigen Parameter lagen sehr eng beieinander und der Populationsmittelwert für die Lagerneigung lag über den Elternwerten.

Tabelle 7: Kenngrößen der Population und der Kreuzungseltern für die erfassten agronomischen Merkmale. Die Daten basieren auf den Mittelwerten über die Umwelten.

Merkmal	Alexis	Steina	Eltern- mittel	Populations- mittel	Min.	Max.
WH	69,0	81,0	75,0	76,6	62,0	85,2
AES	165	164	165	164	159	169
LA	1,0	1,3	1,2	1,8	1,0	4,0

(Abkürzungen: WH: Wuchshöhe (cm); AES: Zeitpunkt des Ährenschiebens (Tage nach 01.01.); LA: Lager (Boniturstufen 1-9)).

Die Linien der Population zeigten nur für den Zeitpunkt des Ährenschiebens eine kontinuierliche Verteilung, die nicht von einer Normalverteilung abwich. Die Verteilung für die Lagerneigung war extrem linksschief und wich signifikant von einer Normalverteilung ab. Bei der Verteilung für die Wuchshöhe konnten zwei Maxima differenziert werden, welche durch die Anwesenheit des *denso*-Locus verursacht wurden (Abbildung 7).

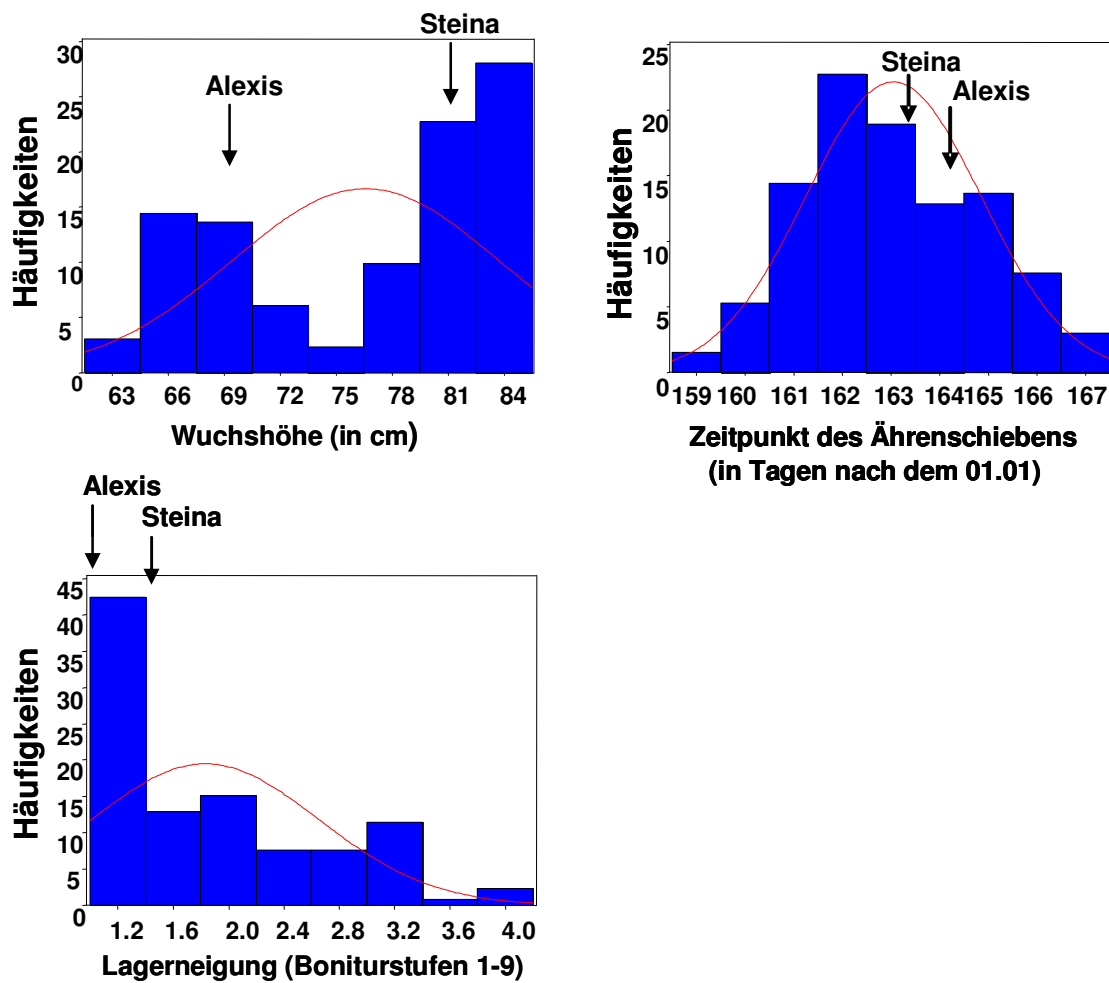


Abbildung 7: Häufigkeitsverteilung der 132 DH-Linien der Kartierungspopulation für die Mittelwerte der einzelnen agronomischen Merkmale über die jeweiligen Umwelten. Die Mittelwerte der Eltern sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Die Korrelationskoeffizienten zwischen den Umwelten lagen für die Wuchshöhe zwischen 0,82 ($p < 0,01$) und 0,84 ($p < 0,01$), für den Zeitpunkt des Ährenschiebens zwischen 0,69 ($p < 0,01$) und 0,83 ($p < 0,01$) und für die Lagerneigung zwischen 0,12 (n.s.) und 0,49 ($p < 0,01$).

Unter Anwendung nichtparametrischer Testverfahren ergab sich bei allen Merkmalen ein hochsignifikanter Einfluß von Genotyp und Umwelt ($p < 0,01$).

Die Heritabilität war für die Merkmale Wuchshöhe und Zeitpunkt des Ährenschiebens sehr hoch. Sie lag für die Wuchshöhe bei $h^2 = 0,89$ (95%iges Konfidenzintervall = 0,84-0,91) und für den Zeitpunkt des Ährenschiebens bei $h^2 = 0,88$ (0,84-0,91). Die Heritabilität für die Lagerneigung lag in einem mittleren Bereich von $h^2 = 0,54$ (0,39-0,65).

Zwischen dem Zeitpunkt des Ährenschiebens und den Merkmalen Wuchshöhe und Lagerneigung gab es hochsignifikante negative Korrelationen (-0,71 und -0,59, $p < 0,01$), wohingegen Wuchshöhe und Lagerneigung hochsignifikant positiv korreliert waren (0,67, $p < 0,01$).

3.2.1 Korrelationen von agronomischen Merkmalen und Malzqualität

Die Tabelle A3 im Anhang fasst die Ergebnisse der Korrelationsanalyse zwischen Malzqualität und agronomischen Merkmalen zusammen. Hohe Korrelationen ($p < 0,01$) konnten zwischen den agronomischen Merkmalen und dem Rohproteingehalt, dem Gehalt an löslichem Stickstoff, Friabilimeter und Endvergärungsgrad festgestellt werden. Auffallend waren vor allem die hohen positiven Korrelationen zwischen Rohproteingehalt und den Merkmalen Wuchshöhe und Lagerneigung sowie die hohe negative Korrelation mit dem Zeitpunkt des Ährenschiebens.

3.3 cDNA-AFLP-Analyse und molekulare Kartierung der Population

Die Population der Alexis \times Steina Kreuzung wurde zum Zeitpunkt 24 h nach Beginn der Vermälzung mit 36 cDNA-AFLP-Primerkombinationen des Enzymsystems *PstI/MseI* gescreent. Hierbei konnten insgesamt 230 polymorphe TDFs detektiert werden. Durchschnittlich waren dies 6,4 Polymorphismen pro Primerkombination, wobei die Spanne zwischen 2 und 15 ausgewerteten Markern lag. Die Fragmente waren zwischen 80-700 bp groß.

Die genomische Markeranalyse der Population umfasste SSR- und SNP-Marker sowie AFLP-Marker des Enzymsystems *EcoRI/MseI* und *PstI/MseI*. Auf genomische Markerdaten der Alexis \times Steina Population konnte bereits aus früheren Arbeiten (Kipp 1998, Hartl et al. 2000) zurückgegriffen werden. Die Markerdaten für 59 AFLP-Marker des Enzymsystems *EcoRI/MseI* sowie für fünf Mikrosatelliten (HVM 3, 4, 5 14 und 68) wurden aus der Arbeit von Kipp (1998) entnommen. Zusätzlich wurde die Population mit weiteren 42 genomischen AFLP-Markern des Enzymsystems *PstI/MseI* genotypisiert. Von den etwa 200 neu gescreenten Mikrosatelliten waren 67 polymorph (Polymorphiegrad von 33,5%). Es wurden weiterhin 40 aus ESTs abgeleitete SNP-Marker auf Polymorphie zwischen Alexis und Steina getestet, von denen sieben polymorph waren und kartiert werden konnten. Dies entspricht einem Polymorphiegrad

von 17,5%. Außerdem konnte ein SNP-Marker, der auf einem Kandidatengen für die *Alpha-Amylase1* beruht, auf Chromosom 6H lokalisiert werden (*amy1*).

Das Markergerüst der Transkriptomkarte wurde unter Verwendung von insgesamt 101 genomischen AFLP-Markern, 62 Mikrosatelliten, sieben SNP-Markern und einem Kandidatengen für die *Alpha-Amylase1* erstellt. Zusätzlich zu diesen Markern wurde für die Kartierung außerdem der *denso*-Locus auf Chromosom 3H als morphologischer Marker berücksichtigt. Die Mikrosatelliten wurden als Ankermarker für die chromosomale Zuordnung genutzt. 79 cDNA-AFLP-Marker konnten in die Karte integriert werden (Abbildung 8). Die Transkriptommarker verteilten sich über alle Chromosomen, wobei Cluster von Transkriptommarkern auf Chromosom 3H und Chromosom 5H beobachtet werden konnten. Die restlichen cDNA-AFLP-Marker lagen ungekoppelt vor oder clusterten in kleinen Gruppen von drei bis fünf Markern, die keinem Chromosom zugeordnet werden konnten.

Die Transkriptomkarte bestand aus 13 Kopplungsgruppen und umfasste insgesamt 1138 cM mit einem durchschnittlichen Markerabstand von 4,7 cM. Die Anzahl der Loci in den Gruppen variierte von 5 bis 36. Eine schiefe Spaltung der kartierten Marker konnte vor allem auf den Chromosomen 4H, 5H und 6H festgestellt werden. Auf den Chromosomen 1H, 2H, 3H und 7H wichen nur einzelne Marker signifikant vom erwarteten Spaltungsverhältnis ab (Ergebnisse nicht gezeigt).

Mit dem Ziel den Genotyp der Linien im Abstand von 5-10 cM zu erfassen, wurden für die QTL-Verrechnung Marker aus der Karte ausgewählt, und die Verrechnung wurde anschließend mit einem Kartengerüst von 164 Markern durchgeführt. Die Transkriptommarker, die in die Karte integriert werden konnten, wurden mit Ausnahme von cosegregierenden Markern und den TDFs cP67M62_270 und cP76M52_228, welche für die QTL-Verrechnung zu viele fehlende Datenpunkte hatten, alle in die QTL-Analyse einbezogen.

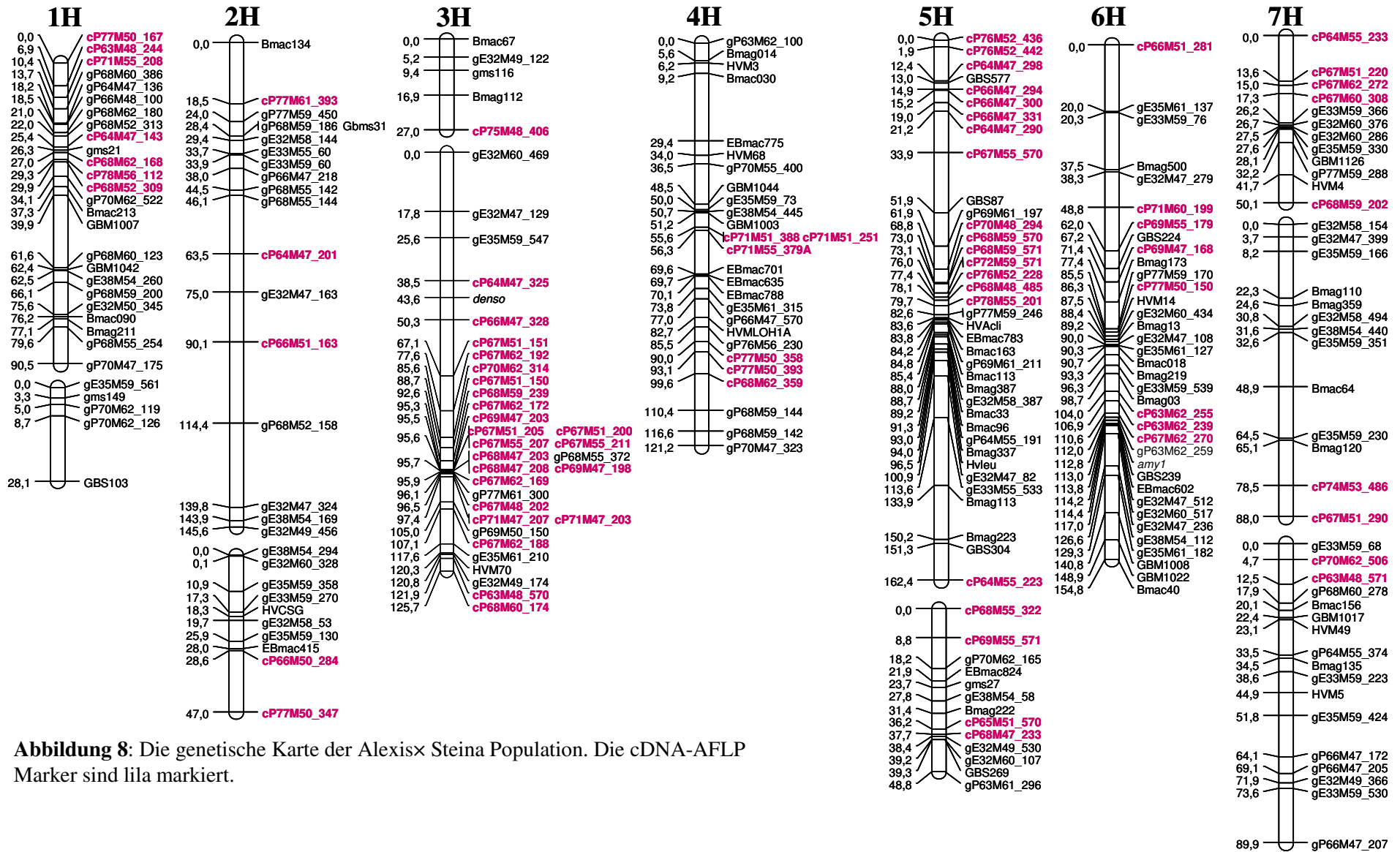


Abbildung 8: Die genetische Karte der Alexixx Steina Population. Die cDNA-AFLP Marker sind lila markiert.

3.4 QTL-Analyse

Für die QTL-Analysen wurden die phänotypischen Daten der einzelnen Umwelten verwendet und mit der MULTI ENVIRONMENT OPTION im MULTIPLE INTERVALL MAPPING (MIM) mit den genotypischen Daten der Population verrechnet. Mit der MULTI ENVIRONMENT OPTION konnte die Verrechnung über alle Umwelten durchgeführt und die Varianzen zwischen den Umwelten erfasst werden. Die Aussagekraft der QTL-Analyse wurde dadurch erhöht.

Die Tabellen mit den Ergebnissen der QTL-Analyse beinhalten ausschließlich die im MIM mittels MULTI ENVIRONMENT OPTION detektierten QTLs, deren LOD-Werte nach einem Permutationstest ($n=1000$, $p=0,001$) über dem berechneten Schwellenwert lagen. Die cDNA-AFLP-Marker, welche QTL-Intervalle flankierten, sind in den Tabellen mit der Farbe Lila markiert.

3.4.1 QTL-Analyse der Malzqualität

3.4.1.1 VZ45°C

Im MIM wurden zehn signifikante QTLs gefunden, die zusammen 53,5% der phänotypischen Varianz erklärten (Tabelle 8). Die beiden Haupt-QTLs auf Chromosom 6H und 5H erklärten jeweils etwa 10% der phänotypischen Varianz und wurden beide von cDNA-AFLP-Markern flankiert.

Tabelle 8: QTL-Analyse für die VZ45°C (MIM). Dargestellt sind der QTL-Name, die chromosomale Lokalisierung (Chr.), das Markerintervall, die LOD-Werte (LOD), Prozent der erklärten phänotypischen Varianz ($R^2\%$), die additiven Effekte (Add.) für die Mittelwerte und der Donor des positiven Allels (Donor).

QTL	Chr.	Markerintervall	LOD	$R^2\%$	Add.	Donor
QVZ1	6H	cP63M62_239-amy1	36	10,0	3,0	Alexis
QVZ2	5H	cP68M59_571-cP72M59_571	32	10,1	3,1	Alexis
QVZ3	2H	gP68M52_158-gE32M47_324	22	9,4	2,8	Alexis
QVZ4	5H	GBS304-cP642M55_223	21	5,4	2,1	Alexis
QVZ5	1H	gP68M59_200-Bmac90	17	4,0	1,8	Alexis
QVZ6	4H	gP68M59_144-gP70M47_323	13	3,4	1,7	Alexis
QVZ7	3H	denso-cP66M47_328	13	3,2	1,7	Steina
QVZ8	7H	Bmag110-gE35M59_351	11	2,6	1,4	Steina
QVZ9	3H	Bmag112-cP75M48_406	9	2,1	1,4	Alexis
QVZ10	5H	gP70M62_165-EBmac824	9	3,3	1,5	Alexis

Erklärte phänotypische Varianz des Gesamtmodells für die $VZ_{45^{\circ}C}$ $R^2 = 53,5\%$.

Auf Chromosom 5H konnte in der QTL-Region ein Cluster von Transkriptommarkern detektiert werden. Der QTL auf Chromosom 6H war direkt am Locus eines Kandidatengens für die *Alpha-Amylase1*, einem Schlüsselenzym während des Vermälzungsprozesses, lokalisiert. Die Effekte beider Haupt-QTLs kamen dabei vom qualitativ besseren Elter Alexis. Weitere QTLs für die $VZ_{45^{\circ}C}$ konnten auf den Chromosomen 1H, 2H, 3H, 4H, 5H und 7H detektiert werden, die zwischen 2,1% und 9,4% der phänotypischen Varianz erklärten. Drei von diesen acht QTL-Intervallen waren ebenfalls mit Transkriptommarkern gekoppelt.

In Abbildung 9 sind exemplarisch die Verteilungen für die $VZ_{45^{\circ}C}$ nach den Genotypenklassen für die beiden Haupt-QTLs dargestellt. Die Markerklasse mit den Allelen des qualitativ schlechteren Elters zeigte eine durchschnittliche $VZ_{45^{\circ}C}$ von 38,8%. Im Vergleich dazu erhöhten QTLVZ1 und QTLVZ2 die Werte für die $VZ_{45^{\circ}C}$ signifikant um jeweils 4%. Wurden beide QTLs kombiniert, so zeigten diese Linien eine durchschnittliche $VZ_{45^{\circ}C}$ von 46,2% und damit eine Erhöhung um 7,4%.

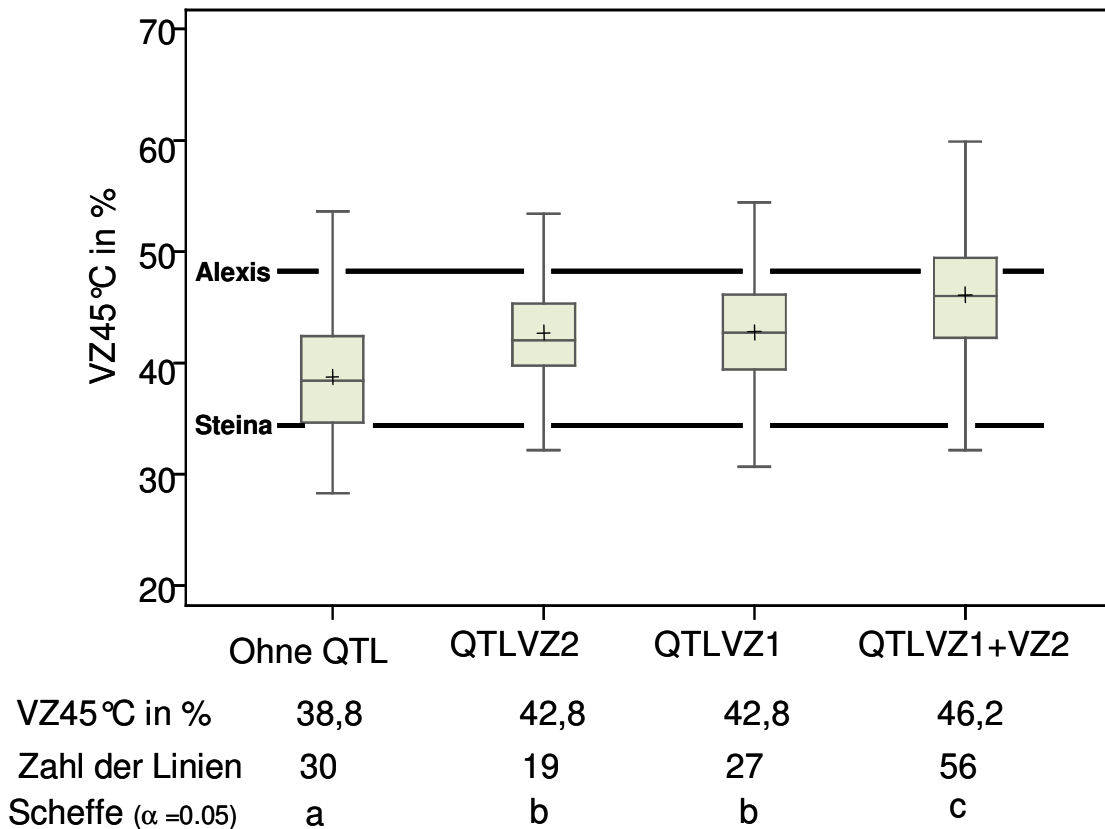


Abbildung 9: Boxplot-Verteilungen der vier Markerklassen mit den Allelen des qualitativ besseren und/oder schlechteren Elters der QTL-Regionen auf den Chromosomen 5H und 6H. Die Daten basieren auf den Werten aus sieben Umwelten. Durchgezogene Linien: Median, +: Mittelwert, verschiedene Buchstaben beim Scheffe-Test weisen auf signifikante Unterschiede nach einem multiplen Mittelwertvergleich hin.

3.4.1.2 Proteolytische Parameter

Rohproteingehalt

Für den Rohproteingehalt wurden im MIM vier signifikante QTLs identifiziert (Tabelle 9). Insgesamt erklärten diese 31% der phänotypischen Varianz. Der Haupt-QTL wurde auf Chromosom 3H direkt am *denso*-Locus kartiert. Donor des QTL-Effektes war der Elter Alexis. Ein weiterer QTL für den Rohproteingehalt konnte auf Chromosom 5H in derselben Region wie der Haupt-QTL für die VZ45°C detektiert werden, und war ebenfalls mit cDNA-AFLP-Markern gekoppelt.

Tabelle 9: QTL-Analyse für den Rohproteingehalt (MIM). Beschreibung der Tabelle wie in Tabelle 8.

QTL	Chr.	Markerintervall	LOD	R ² %	Add.	Donor
QRP1	3H	<i>denso</i> -cP66M47_328	54	18,4	-0,4	Alexis
QRP2	4H	gP66M47_570-HVMLOH1A	16	4,6	-0,2	Steina
QRP3	5H	cP70M48_294-cP68M59_571	12	5,2	-0,2	Alexis
QRP4	2H	gE33M59_270-HVCSG	10	2,8	-0,2	Alexis

Erklärte phänotypische Varianz des Gesamtmodells für den Rohproteingehalt R² = 31%

Gehalt an löslichem Stickstoff

Die für das Merkmal Gehalt an löslichem Stickstoff im MIM gefundenen signifikanten QTLs sind in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10: QTL-Analyse für den Gehalt an löslichen Stickstoff (MIM). Beschreibung der Tabelle wie in Tabelle 8.

QTL	Chr.	Markerintervall	LOD	R ² %	Add.	Donor
QLN1	3H	cP64M47_325- <i>denso</i>	39	9,0	33,2	Steina
QLN2	5H	GBS304-cP64M55_223	30	8,6	32,0	Alexis
QLN3	5H	cP72M59_571-cP68M48_485	27	9,2	32,0	Alexis
QLN4	7H	HVM5-gE35M59_424	21	9,2	31,2	Alexis
QLN5	1H	gP68M59_200-Bmac90	14	3,2	20,3	Alexis
QLN6	4H	HVMLOH1A-cP77M50_358	12	2,6	16,8	Alexis
QLN7	3H	Bmag112-cP75M48_406	11	2,4	16,6	Alexis
QLN8	5H	gP70M62_165-EBmac824	8	1,7	13,3	Alexis

Erklärte phänotypische Varianz des Gesamtmodells für den Gehalt an löslichem Stickstoff R²= 45,9%

Vier der acht gefundenen QTLs erklärten jeweils zwischen 8,6% und 9,2% der phänotypischen Varianz. Drei dieser QTL-Intervalle wurden von Transkriptommarkern flankiert. Der QTL mit dem höchsten LOD-Wert war, wie der Haupt-QTL des Rohproteingehaltes ebenfalls, am *denso*-Locus lokalisiert. Bis auf diesen Haupt-QTL, dessen Effekt von einem Steina-Allel verursacht wurde, wurden alle anderen QTL-Effekte vom Elter Alexis determiniert.

Eiweißlösungsgrad

Im MIM wurden acht signifikante QTLs für den Eiweißlösungsgrad detektiert, die zwischen 2,1% und 14,1% der phänotypischen Varianz erklärten (Tabelle 11). Der

Haupt-QTL auf Chromosom 5H wurde von Transkriptommarkern flankiert und lag in einer Region, in der bereits QTL für die VZ45°C, den Gehalt an löslichem Stickstoff und den Rohproteingehalt lokalisiert wurden.

Tabelle 11: QTL-Analyse für den Eiweißlösungsgrad (MIM). Beschreibung der Tabelle wie in Tabelle 8.

QTL	Chr.	Markerintervall	LOD	R ² %	Add.	Donor
QELG1	5H	cP72M59_571-cP68M48_485	42	14,2	2,6	Alexis
QELG2	5H	GBS304-cP64M55_223	23	7,3	1,8	Alexis
QELG3	1H	gP68M55_254-gP70M47_175	15	5,5	1,5	Alexis
QELG4	7H	HVM5-gE35M59_424	11	6,4	1,6	Alexis
QELG5	2H	gP68M59_186-gE32M58_144	10	3,0	0,9	Steina
QELG6	3H	gE35M59_547-cP64M47_325	9	2,9	1,0	Steina
QELG7	3H	Bmag112-cP75M48_406	9	2,3	1,0	Alexis
QELG8	6H	GBM1008-GBM1022	9	2,1	0,9	Steina

Erklärte phänotypische Varianz des Gesamtmodells für den Eiweißlösungsgrad R² = 43,5%

3.4.1.3 Cytolytische Parameter

Friabilimeter

In Tabelle 12 sind die im MIM detektierten QTLs für den Friabilimeterwert in der Alexis × Steina Population aufgelistet.

Tabelle 12: QTL-Analyse für den Friabilimeter (MIM). Beschreibung der Tabelle wie in Tabelle 8.

QTL	Chr.	Markerintervall	LOD	R ² %	Add.	Donor
QFRI1	1H	gP68M59_200-Bmac90	15	6,2	3,2	Alexis
QFRI2	5H	cP70M48_294-cP68M59_571	15	5,0	2,6	Alexis
QFRI3	4H	EBmac701-gE35M61_315	13	4,1	2,4	Steina
QFRI4	3H	gE35M59_547-cP64M47_325	11	5,9	2,9	Alexis
QFRI5	3H	Bmac112-cP75M48_406	10	2,8	2,3	Alexis
QFRI6	5H	GBS269-gP63M61_296	10	3,5	2,4	Alexis
QFRI7	7H	Bmag64-Bmag120	8	2,8	2,1	Steina

Erklärte phänotypische Varianz des Gesamtmodells für den Friabilimeterwert R² = 33,2%

Insgesamt wurden sieben signifikante QTLs gefunden, die zusammen 33,2% der phänotypischen Varianz erklärten. Aufgrund großer Umwelteinflüsse auf dieses Merkmal waren die LOD-Werte und auch die R²-Werte der einzelnen QTLs niedrig und der Haupt-QTL auf Chromosom 1H erklärte nur 6,2%.

Brabender

Für den Brabender wurden acht signifikante QTLs in der Population detektiert (Tabelle 13). Der Haupt-QTL lag auf Chromosom 1H im gleichen Intervall wie der Haupt-QTL für den Friabilimeterwert.

Tabelle 13: QTL-Analyse für den Brabender (MIM). Beschreibung der Tabelle wie in Tabelle 8.

QTL	Chr.	Markerintervall	LOD	R ² %	Add.	Donor
QBRA1	1H	gP68M59_200-Bmac90	30	8,2	-6,4	Alexis
QBRA2	4H	gP66M47_570-HVMLOH1A	30	7,2	-5,6	Steina
QBRA3	5H	GBS269-gP63M61_296	25	7,9	-5,8	Alexis
QBRA4	5H	cP70M48_294-cP68M59_571	16	4,0	-3,8	Alexis
QBRA5	3H	denso-cP66M47_328	14	3,5	-3,4	Steina
QBRA6	3H	Bmag112-cP75M48_406	14	2,6	-3,2	Alexis
QBRA7	7H	gE35M59_166-Bmag110	11	2,8	-3,6	Steina
QBRA8	6H	Bmag173-cP77M50_150	10	2,3	-3,3	Alexis

Erklärte phänotypische Varianz des Gesamtmodells für den Brabender R² = 35,1%

Viskosität

Vier signifikante QTLs auf den Chromosomen 1H, 2H, 3H und 6H konnten im MIM für die Viskosität gefunden werden (Tabelle 14). Die insgesamt erklärte phänotypische Varianz bei diesem Merkmal betrug 22,2%. Die QTL-Effekte bei diesem Merkmal kamen alle vom Elter Alexis.

Tabelle 14: QTL-Analyse für die Viskosität (MIM). Beschreibung der Tabelle wie in Tabelle 8.

QTL	Chr.	Markerintervall	LOD	R ² %	Add.	Donor
QVIS1	3H	gE35M59_547-cP64M47_325	13	5,7	-0,013	Alexis
QVIS2	6H	gE32M47_236-gE38M54_112	12	5,0	-0,013	Alexis
QVIS3	1H	gP68M59_200-Bmac90	10	4,6	-0,013	Alexis
QVIS4	2H	gP68M52_158-gE32M47_324	8	4,3	-0,015	Alexis

Erklärte phänotypische Varianz des Gesamtmodells für die Viskosität R² = 19,6%

3.4.1.4 Amylolytische Parameter

Malzextrakt

Für den Malzextrakt konnten im MIM sieben signifikante QTLs detektiert werden, die zwischen 2% und 13,7% der phänotypischen Varianz erklärten (Tabelle 15). Die beiden Haupt-QTLs lagen auf Chromosom 4H und 3H. Die QTL-Effekte wurden beide vom

Elter Steina vererbt. Der QTL auf Chromosom 3H lag in der Region des *denso*-Locus, der QTL auf Chromosom 4H in der Region um den *mlo*-Locus.

Tabelle 15: QTL-Analyse für den Extraktgehalt (MIM). Beschreibung der Tabelle wie in Tabelle 8.

QTL	Chr.	Markerintervall	LOD	R ² %	Add.	Donor
QEX1	4H	gP66M47_570-HVMLOH1A	50	13,7	0,7	Steina
QEX2	3H	cP64M47_325- <i>denso</i>	45	11,4	0,6	Steina
QEX3	1H	gP68M59_200-Bmac90	17	5,2	0,5	Alexis
QEX4	5H	Bmag222-cP65M51_570	17	5,5	0,4	Alexis
QEX5	5H	gE32M47_82-gE33M55_533	12	3,0	0,3	Alexis
QEX6	1H	gP70M62_126-GBS103	8	2,0	0,3	Alexis
QEX7	7H	gP77M59_288-HVM4	7	2,1	0,2	Steina

Erklärte phänotypische Varianz des Gesamtmodells für den Extraktgehalt R² = 42,9%

Endvergärungsgrad

Für den Endvergärungsgrad wurden im MIM vier signifikante QTLs auf den Chromosomen 1H, 3H, 5H und 6H identifiziert, die insgesamt eine phänotypische Varianz von 24,5% erklärten (Tabelle 16). Alle QTL-Effekte gingen vom Elter Alexis aus. Der QTL, der den größten Anteil der Varianz erklärte, war auf Chromosom 1H lokalisiert. Auf Chromosom 6H lag der QTL in der Region des *Alpha-Amylase1*-Locus.

Tabelle 16: QTL-Analyse für den Endvergärungsgrad (MIM). Beschreibung der Tabelle wie in Tabelle 8.

QTL	Chr.	Markerintervall	LOD	R ² %	Add.	Donor
QEV1	1H	gP68M55_254-gP70M47_175	17	9,8	0,6	Alexis
QEV2	6H	<i>amyl1</i> -gE32M47_236	14	5,8	0,6	Alexis
QEV3	5H	gP69M61_211-gE32M58_387	14	4,6	0,4	Alexis
QEV4	3H	gE35M59_547-cP64M47_325	8	4,0	0,4	Alexis

Erklärte phänotypische Varianz des Gesamtmodells für den Endvergärungsgrad R² = 24,5%

Alpha-Amylaseaktivität

Die QTL-Analyse für die Alpha-Amylaseaktivität basierte auf nur einer Umwelt. Die Analyse wurde zusätzlich durchgeführt, um erste Hinweise zu bekommen, inwieweit das Kandidatengen auf Chromosom 6H das Merkmal in diesem Pflanzenmaterial beeinflusst und inwieweit QTLs für die indirekten Malzqualitätsparameter mit putativen QTLs für den Alpha-Amylaseaktivität überlappen.

Die Ergebnisse der QTL-Analyse sind in Tabelle 17 zusammengefasst. Insgesamt konnten sechs QTLs für dieses Merkmal mittels MIM detektiert werden. Der Haupt-QTL lag, bestätigend, am *Alpha-Amylase1*-Locus auf Chromosom 6H und erklärte eine phänotypische Varianz von 29,3%. Der Effekt kam dabei, wie bei allen QTLs für dieses Merkmal, von Alexis. Die QTLs auf den Chromosomen 1H, 2H und 5H lagen in bereits beschriebenen Regionen, in denen weitere QTLs der indirekten Malzqualitätsparameter gefunden wurden.

Tabelle 17: QTL-Analyse für die Alpha-Amylaseaktivität (MIM). Beschreibung der Tabelle wie in Tabelle 8.

QTL	Chr.	Markerintervall	LOD	R ² %	Add.	Donor
QAA1	6H	cP63M62_239-amy1	20	29,3	7,7	Alexis
QAA2	4H	Bmag30-EBmac775	6	8,6	4,2	Alexis
QAA3	5H	cP67M55_570-GBS87	6	7,6	3,9	Alexis
QAA4	5H	Bmag113-GBS304	5	5,1	3,2	Alexis
QAA5	1H	gP68M55_254-gP70M47_175	4	7,8	4,0	Alexis
QAA6	2H	gP68M52_158-gE32M47_324	3	5,1	3,2	Alexis

Erklärte phänotypische Varianz des Gesamtmodells für die Alpha-Amylaseaktivität R² = 63,4%

3.4.1.5 Malzqualitätsindex (MQI)

Für den Malzqualitätsindex wurden im MIM acht signifikante QTLs detektiert (Tabelle 18). Der QTL, der den größten Teil der phänotypischen Varianz erklärte, lag auf Chromosom 4H. Der Effekt kam dabei vom Elter Steina. Ein weiterer QTL war am *Alpha-Amylase1*-Locus auf Chromosom 6H lokalisiert. Fünf der identifizierten QTLs wurden von Transkriptommarkern flankiert und lagen alle in Regionen, in denen bereits QTLs für die anderen Malzqualitätsparameter gefunden wurden.

Tabelle 18: QTL-Analyse für den Malzqualitätsindex (MIM). Beschreibung der Tabelle wie in Tabelle 8.

QTL	Chr.	Markerintervall	LOD	R ² %	Add.	Donor
QMQI1	4H	cP71M51_388-EBmac701	34	9,8	0,6	Steina
QMQI2	6H	amy1-gE32M47_236	28	7,6	0,6	Alexis
QMQI3	1H	gP68M59_200-Bmac90	24	7,2	0,5	Alexis
QMQI4	5H	cP70M48_294-cP68M59_571	22	6,5	0,4	Alexis
QMQI5	3H	cP64M47_325-denso	18	4,0	0,2	Steina
QMQI6	2H	gP68M52_158-gE32M47_324	15	4,4	0,4	Alexis
QMQI7	5H	cP65M51_570-cP68M47_233	15	3,9	0,3	Alexis
QMQI8	3H	Bmag112-cP75M48_406	11	2,7	0,3	Alexis

Erklärte phänotypische Varianz des Gesamtmodells für den MQI $R^2 = 46,1\%$

3.4.2 QTL-Analyse agronomischer Merkmale

3.4.2.1 Wuchshöhe

Es wurde nur eine genomische Region am *denso*-Locus auf Chromosom 3H detektiert, die Einfluss auf dieses Merkmal zeigte (Tabelle 19). Der Locus erklärte 74% der phänotypischen Varianz. Der Effekt kam vom *denso*-Träger Alexis.

Tabelle 19: QTL-Analyse für die Wuchshöhe (MIM). Beschreibung der Tabelle wie in Tabelle 8.

QTL	Chr.	Markerintervall	LOD	$R^2\%$	Add.	Donor
QWH1	3H	cP64M47_325- <i>denso</i>	111	74,0	-13	Alexis

Erklärte phänotypische Varianz des Gesamtmodells für die Wuchshöhe $R^2 = 74\%$

3.4.2.2 Zeitpunkt des Ährenschiebens

Für das Merkmal Zeitpunkt des Ährenschiebens wurden vier QTLs identifiziert (Tabelle 20). Der Haupt-QTL war am *denso*-Locus auf Chromosom 3H lokalisiert und erklärte 37,7% der phänotypischen Varianz. Außerdem wurden weitere QTLs auf Chromosom 1H, 4H und 5H identifiziert, die zwischen 2,9% und 11,6% erklärten.

Tabelle 20: QTL-Analyse für den Zeitpunkt des Ährenschiebens (MIM). Beschreibung der Tabelle wie in Tabelle 8.

QTL	Chr.	Markerintervall	LOD	$R^2\%$	Add.	Donor
QAES1	3H	cP64M47_325- <i>denso</i>	118	37,7	-3,6	Steina
QAES2	5H	gP69M61_211-gE32M58_387	33	11,6	-1,9	Steina
QAES3	4H	Bmac30-EBmac775	18	6,5	-1,5	Alexis
QAES4	1H	gP68M55_254-gP70M47_175	9	2,9	-0,7	Alexis

Erklärte phänotypische Varianz des Gesamtmodells für das Ährenschieben $R^2 = 59\%$

3.4.2.3 Lagerneigung

In Tabelle 21 sind die für die Lagerneigung gefundenen QTLs dargestellt. Der QTL mit dem größten Einfluß von 25% lag ebenfalls in der Region des *denso*-Locus auf Chromosom 3H.

Tabelle 21: QTL-Analyse für die Lagerneigung (MIM). Beschreibung der Tabelle wie in Tabelle 8.

QTL	Chr.	Markerintervall	LOD	R²%	Add.	Donor
QLA1	3H	<i>denso-cP66M47_328</i>	39	25,0	-1,2	Alexis
QLA2	2H	<i>cP66M51_163-gP68M52_158</i>	6	4,2	-0,5	Steina
QLA3	4H	<i>HVMLOH1A-cP77M50_358</i>	6	3,3	-0,3	Steina

Erklärte phänotypische Varianz des Gesamtmodells für die Lagerneigung $R^2 = 32,5\%$

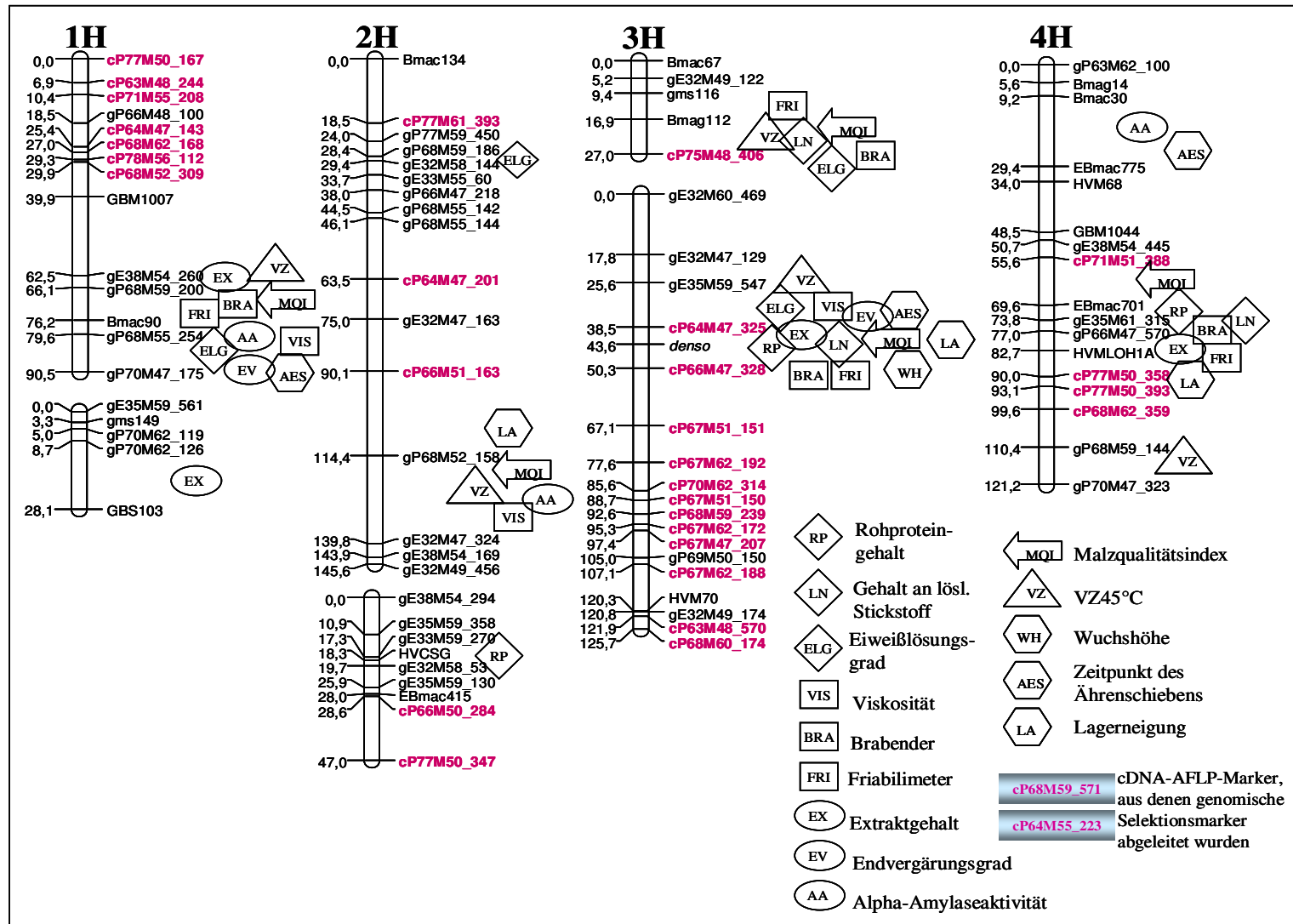
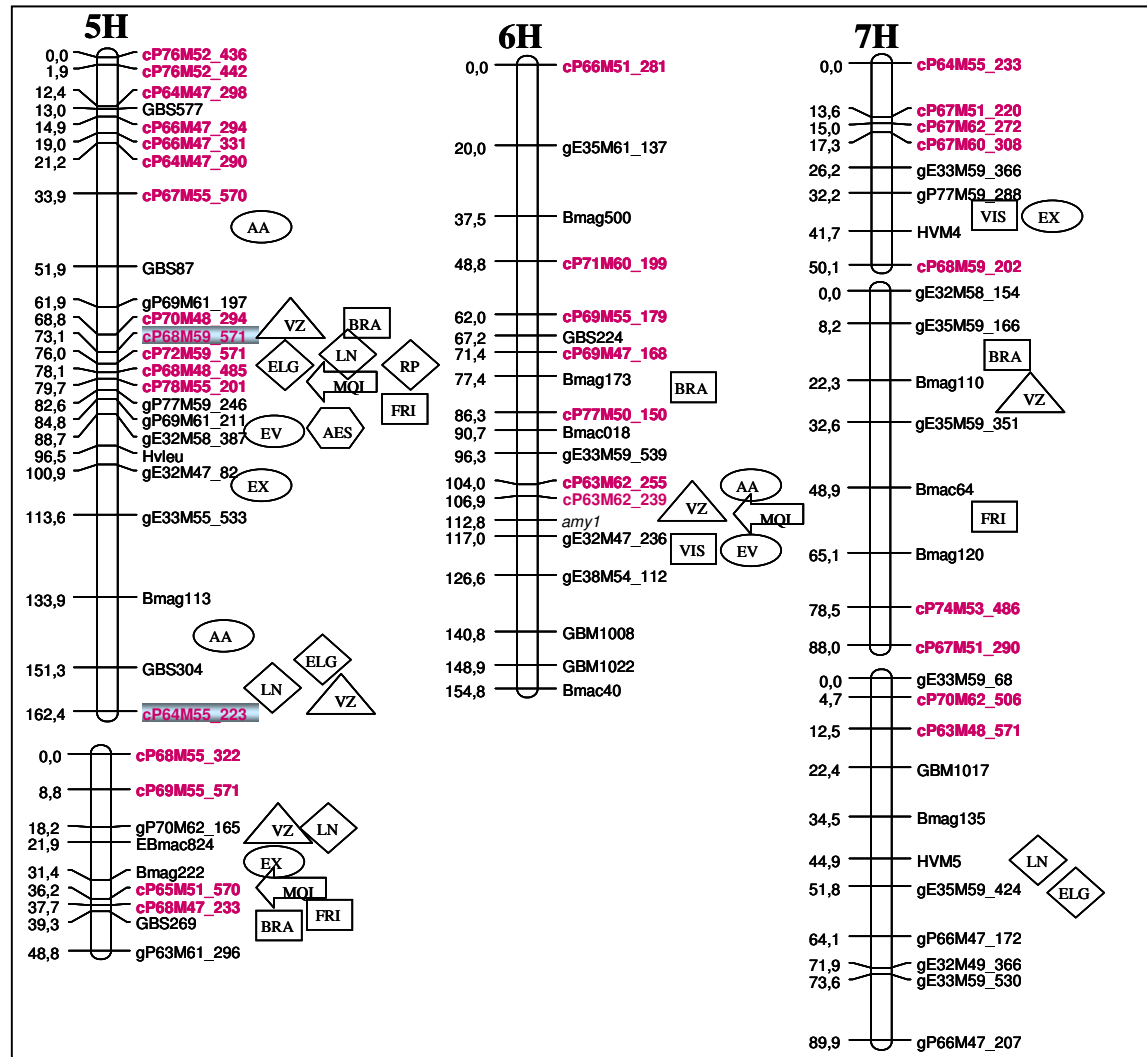


Abbildung 10: Positionen der detektierten QTLs auf der Kopplungskarte der Alexis x Steina Population.



Fortsetzung Abbildung 10.

3.5 Einfluss von Transkriptommarkern auf die Malzqualität

Die Zusammenfassung der QTL-Analyse für die Malzqualität in Abbildung 10 veranschaulicht, dass eine Reihe von Transkriptommarkern mit QTLs für die Malzqualität assoziiert war. Vor allem auf den Chromosomen 5H und 3H wurden QTL-Cluster von cDNA-AFLP-Markern flankiert.

Wurden die Linien der Alexis × Steina Population anhand von QTL-assoziierten Transkriptommarkern klassifiziert, so zeigten die Linien, die jeweils die Allele des qualitativ besseren Elters anzeigten, für die verschiedenen Malzqualitätsparameter relative Verbesserungen von bis zu 5% gegenüber dem Populationsmittelwert (Abbildung 11). Die vier hier dargestellten Transkriptommarker flankieren QTL-Intervalle auf verschiedenen Chromosomen.

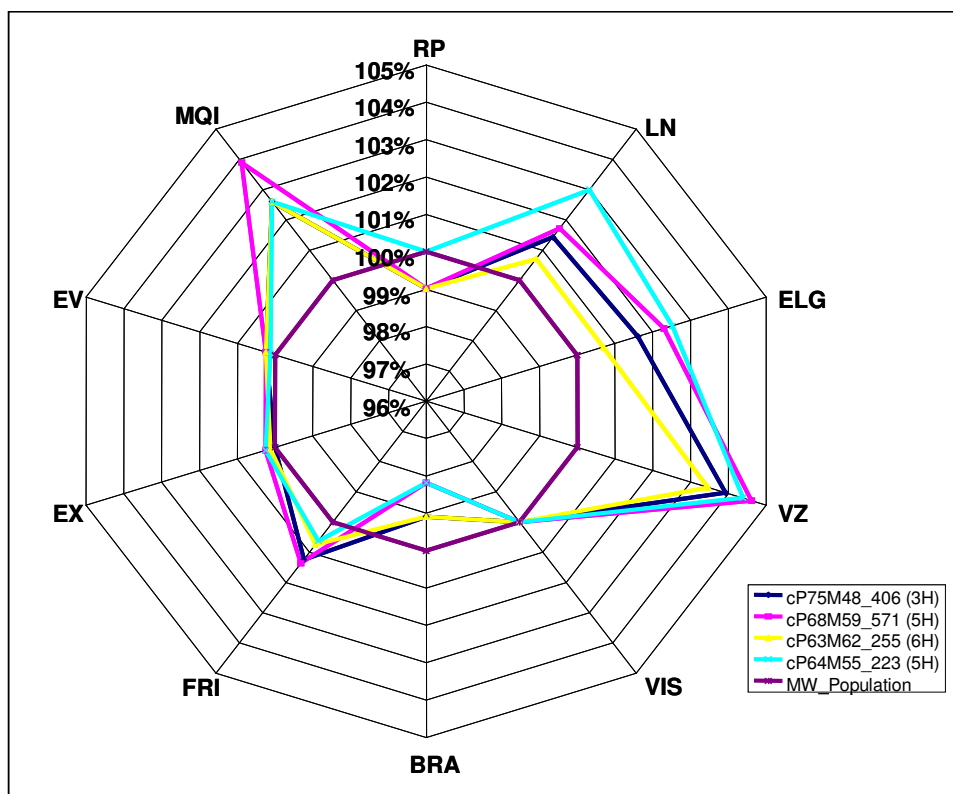


Abbildung 11: Selektionserfolg ausgesuchter Transkriptommarker für die einzelnen Malzqualitätsparameter innerhalb der Population. Im Netzdiagramm dargestellt ist die relative Veränderung des Mittelwertes der mit den jeweils günstigen Allelen der cDNA-AFLP Marker klassifizierten Linien im Vergleich zum Mittelwert der Population (MW_Population). Die Mittelwerte basieren auf den sieben bzw. acht Umwelten. Abkürzungen siehe Tabelle 4.

Die absoluten Mittelwertunterschiede zwischen Linien, welche jeweils die verschiedenen Allele trugen, zeigt Tabelle 22. Für nahezu alle Parameter lagen die Unterschiede zwischen den klassifizierten Linien im signifikanten Bereich.

Tabelle 22: Ergebnisse der Mittelwertvergleiche zwischen den Linien, welche jeweils das Alexis bzw. Steina Allel trugen. Verschiedene Buchstaben weisen auf signifikante Unterschiede nach einem multiplen Mittelwertvergleich hin (Scheffe-Test, $p \leq 0,05$). Abkürzungen siehe Tabelle 4.

Merkmal	cP63M62_255		cP64M55_223		cP68M59_571		cP75M48_406	
	Alexis	Steina	Alexis	Steina	Alexis	Steina	Alexis	Steina
VZ	44,8 ^a	40,5 ^b	45,2 ^a	42,0 ^b	45,3 ^a	40,7 ^b	45,0 ^a	41,7 ^b
RP	10,0 ^a	10,1 ^b	10,1	10,1	10,0 ^a	10,2 ^b	10,1	10,1
LN	705 ^a	691 ^b	721 ^a	686 ^b	712 ^a	683 ^b	710 ^a	692 ^b
ELG	43,9 ^a	42,7 ^b	44,7 ^a	42,7 ^b	44,6 ^a	42,0 ^b	44,3 ^a	42,9 ^b
FRI	81,4 ^a	79,4 ^b	81,3 ^a	80,1 ^b	81,9 ^a	79,1 ^b	81,8 ^a	79,7 ^b
BRA	109 ^a	112 ^b	108 ^a	111 ^b	108 ^a	112 ^b	109	111
VIS	1,51 ^a	1,52 ^b	1,51 ^a	1,52 ^b	1,51 ^a	1,51 ^b	1,51 ^a	1,52 ^b
EX	82,1 ^a	81,9 ^b	82,2 ^a	81,9 ^b	82,2 ^a	81,9 ^b	82,0	82,1
EV	82,9 ^a	82,3 ^b	82,8 ^a	82,6 ^b	82,9 ^a	82,4 ^b	82,9 ^a	82,5
MQI	7,9 ^a	7,3 ^b	7,9 ^a	7,5 ^b	8,0 ^a	7,3 ^b	7,9 ^a	7,5 ^b

3.6 QTL-basierte Fragmentanalyse

Basierend auf der QTL-Kartierung wurden cDNA-AFLP-Marker in enger Kopplung zu quantitativen Effekten der Malzqualität isoliert, kloniert und sequenziert, um in einer anschließenden BLAST-Abfrage Hinweise auf putative Funktionen zu bekommen und, falls möglich, funktionelle Marker für Malzqualität zu entwickeln.

Bis auf das Fragment cP63M62_239, welches auf Chromosom 6H lokalisiert war und dessen weitere Bearbeitung durch Schwierigkeiten bei der Klonierung als zu zeitaufwendig angesehen und nicht weiterverfolgt wurde, konnten alle anderen ausgewählten Fragmente zur Sequenzanalyse herangezogen werden. Es zeigte sich nach Analyse der Sequenzen, dass die cosegregierenden Fragmente cP68M59_571 (657 bp)/ cP68M59_570 (590 bp) und cP71M51_250 (227 bp)/ cP71M51_388 (363 bp) homolog waren und somit innerhalb der Sequenz weitere Schnittstellen vorgelegen haben

müssen. Für die weitere Bearbeitung bzw. Analyse wurden jeweils nur die beiden größeren Fragmente genutzt.

In Tabelle 23 ist eine Zusammenfassung der analysierten Fragmente mit den zugehörigen BLAST-Abfrage Ergebnissen gegeben. Die Sequenzen der Fragmente sind in Tabelle A4 im Anhang beschrieben.

Wichtigen cDNA-AFLP-Fragmenten, die in QTL-Regionen mit großen Effekten lokalisiert sind, wie z.B. cP68M59_571 (5H), cP72M59_571 (5H), cP78M55_201 (5H) oder cP63M62_255 (6H), konnte noch keine Funktion zugeordnet werden. Ein Teil der analysierten cDNA-AFLP-Fragmente zeigte Homologien zu Genen, die für Komponenten der Signaltransduktion codieren. So zeigten die TDFs cP75M48_406, cP64M47_325 (3H) und cP66M47_328 (3H) Ähnlichkeiten mit einer Phosphodiesterase, einer Serin/Threonin Kinase und einer Phosphatase.

Das Fragment cP68M48_488 im QTL-Intervall 5H zeigte hohe Homologien zu einem für ein Rab-Protein codierendes Gen aus Reis. Rab-Proteine spielen als GTP- bindende Proteine eine Rolle in der Signaltransduktion in Aleuronzellen. Für den Transkriptommarker cP64M55_223 (5H) bestanden Homologien zu einem SKP1-Protein, einer Komponente des sogenannten SCF-Komplexes. Dieser Komplex hat eine Vielzahl von Signalfunktionen in biologischen Prozessen, unter anderem ist er in proteolytische Prozesse während der Embryoentwicklung involviert und spielt ebenfalls eine Rolle in der Gibberellin Signalgebung, indem es die Inhibitoren des Hormons abbaut. Gibberellin setzt ebenfalls über weitere Signaltransduktionsketten die Sekretion von Alpha-Amylasen und anderen hydrolytischen Enzymen in Gang.

Mit Ausnahme des Fragmentes cP66M47_328 konnten für alle weiteren sequenzierten TDFs homologe ESTs identifiziert werden, die für weitere Analysen und die Markerentwicklung genutzt werden konnten (Tabelle 34).

Tabelle 23: Ergebnisse der BLAST-Abfrage für die sequenzierten cDNA-AFLP Fragmente

TDF_Nr.	Fragmentname	Chrom.	Größe	EST-Hit	BLASTN-Hit
1	cP64M47_325	3H	304	BG418539.1 (<i>H.vulgare</i>) 7e ⁻¹⁵² , 99%	NP_190695.2 (<i>A. thaliana</i>) put. ATP-binding/Serine-Threonine Kinase 1,3e ⁻⁰⁹ , 40%
2	cP66M47_328	3H	306	-	ABN65876.2 (<i>Pichia stipitis</i>) Inositol-1,4,5-triphosphat-5-Phosphatase 1,1e ⁻¹⁶ , 42%
3	cP75M48_406	3H	381	AV832592.1 (<i>H.vulgare</i>) 0, 99%	AAT78755.1 (<i>O.sativa</i>) put. Phosphodiesterase Family 3,5e ⁻²³ , 61%
4	cP71M51_388	4H	363	CB864702.1 (<i>H.vulgare</i>) 0, 99%	TA50158_4565 (<i>O.sativa</i>) put. 60S ribos. Prot. L1 2,4e ⁻⁴⁹ , 83%
5	cP77M50_358	4H	336	DT711529.1 (<i>F. arundinacea</i>) 4e ⁻²⁹ , 81%	-
6	cP64M55_223	5H	199	AJ4818151 (<i>H.vulgare</i>) 3e ⁻⁹¹ , 98%	AAT09201.1 (<i>O.sativa</i>) SKP1-like Protein 9,1e ⁻¹¹ , 62%
7	cP65M51_570	5H	800	AK119255 (<i>O.sativa</i>) 0, 100%	X67711.1 OSHSC70A (<i>O.sativa</i>) hsp70gene for Heat Shock Protein 70 0, 100%
8	cP67M55_570	5H	584	CA031252.1 (<i>H.vulgare</i>) 2e ⁻¹⁵⁰ , 79%	EAZ26408.1 (<i>O.sativa</i>) Hypothetical Protein 6,2e ⁻⁷¹ , 74%

9	cP68M48_488	5H	462	BJ467500.1 (<i>H.vulgare</i>) 0, 99%	CK161351 (<i>O.sativa</i>) put.Ras-related Prot. Rab $3.9e^{-82}$, 92%
10	cP68M59_571	5H	657	BG367081.1 (<i>H.vulgare</i>) 0, 91%	AK249221.1 (<i>H.vulgare</i>) cDNA clone, 0, 98%
11	cP70M48_294	5H	274	BQ763676.1 (<i>H.vulgare</i>) $1,7e^{-125}$, 99%	DR741378 (<i>O.sativa</i>) put.NAC-domain Prot. 0,0094, 60%
12	cP72M59_571	5H	657	CV0556161.1 (<i>H.vulgare</i>) 0, 98%	AK249632.1 (<i>H.vulgare</i>) cDNA clone, 0, 99%
13	cP76M52_228	5H	204	BQ548049.1 (<i>H.vulgare</i>) $5e^{06}$, 100%	-
14	cP78M55_201	5H	178	AV913670.1 (<i>H.vulgare</i>) $3e^{-39}$, 92%	-
15	cP63M62_259	6H	234	BE516091(<i>T.aestivum</i>) $8e^{-68}$, 94%	AK0685271 (<i>O.sativa</i>) cDNA clone $2e^{-13}$, 71%
16	cP67M62_270	6H	249	CA010527.1 (<i>H.vulgare</i>) $2e^{-95}$, 99%	CA660041 (<i>O. sativa</i>) put. Nucleoid DNA binding Protein, $4.2 e^{-07}$, 76%
17	cP77M50_150	6H	111	BY871669.1 (<i>H. vulgare</i>) $3e^{-49}$, 100%	TA58794_4565 (<i>T. aestivum</i>) Histon H3 $2.6e^{-08}$

3.7 Ableitung von genomischen Selektionsmarkern aus polymorphen Transkripten

Die cDNA-AFLP-Methode kann zusätzlich zur Detektion von differentiell exprimierten Genen auch zum Auffinden von Polymorphismen in der Restriktionsschnittstelle und/oder Primerbindungsstelle führen. Der Großteil der in den QTL-Intervallen lokalisierten Transkriptommarker zeigte einen klaren Vorhanden/ Nicht-Vorhanden (striker 0/1) Polymorphismus und dies ist ein Hinweis, dass nicht differentiell exprimierte Gene, sondern Sequenzunterschiede für die detektierten Polymorphismen verantwortlich waren. Zur Aufklärung der Polymorphismen und mit dem Ziel funktionelle Marker zu entwickeln, mit denen auf genomischer Ebene selektiert werden kann, wurden zunächst Alignments zwischen homologen ESTs, welche in einer BLAST-Abfrage detektiert wurden, und den ausgewählten TDFs durchgeführt. Die Sequenz der TDFs konnte so über die flankierenden Schnittstellen hinaus verlängert werden. Primerpaare, die diese Schnittstellen umschlossen, wurden entwickelt, PCR-Analysen mit den Kreuzungseltern auf cDNA- und genomischer Ebene durchgeführt, und anschließend jeweils ein *Pst*I- und/oder ein *Mse*I-Verdau angesetzt. Für die Fragmente cP63M62_255, cP68M59_571, cP70M48_294, und cP78M55_201 konnte die Sequenz nur über die *Mse*I-Schnittstelle verlängert werden. Die Sequenz des Transkriptommarkers cP68M48_488 wurde über die *Pst*I-Schnittstelle verlängert und für das TDF cP64M55_223 konnten Primer entwickelt werden, die beide Schnittstellen umschlossen (Abbildung 12). Nur der *Pst*I-Verdau des Fragmentes cP64M55_223 zeigte einen Polymorphismus zwischen den Kreuzungseltern Alexis und Steina (Abbildung 13c). Der polymorphe Charakter dieses TDFs beruht daher auf einem SNP innerhalb der *Pst*I-Schnittstelle. Alle anderen Fragmente waren nach dem Verdau zwischen den Eltern monomorph und wurden vorerst nicht weiterbearbeitet. Nach dem Polymorphietest wurde der entwickelte CAPS-Marker auf der gesamten Alexis × Steina Population getestet und zusätzlich wurde ein Sortiment von 40 Gerstensorten mit diesem Marker genotypisiert (Abbildung 13f).

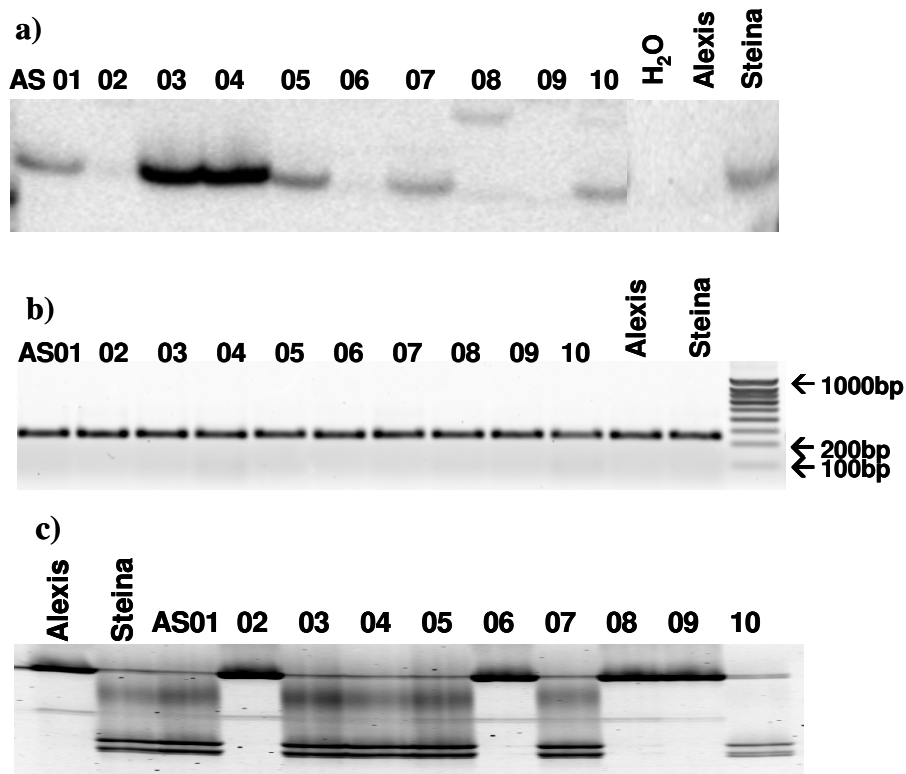
```

1 TGGTGATGTTGCGGAGCGAGGACGGCGTGGACTTCGTGTTATCAGAGGCAGAAGCAGAGG
61 CAGAGGCCCTGTTTGGCAGGAAAATCAGAATAATGATGAAGTACGAGTCGGAGAAGCACG
121 TCATCCCTTCCGACGACGGCGGCGAAAATCAGGTACTGCCTCATCCGCTCTCCGTCGAG
181 GCGACACACTCTCCAAGGTGATGGACTACTCCAGGACGCACGCCTCCGGATCCCACGACT
241 TGAGCGACTGGGATGCAGATTTTCATCGCTGGTTTCAACCACGAGGCCCTCTTCGATCTCA
301 TCCTGGCTTCGGAATATCTTCAAATAAGAGGACTGATTGACCTAGCCTGCCAGACTGTTG
361 CTAGTAAGATAAAGGGAAAATCTCCACGCGAAAATTTGTAATATCTTTAACATAAAAAAGTG
421 TCTTTGCTCCAGAATTAGATGGAGACACGATAGCAAAGCGATTGCAAGATTCCACAACAT

```

Abbildung 12: Das cDNA-AFLP-Fragment cP64M55_223 (fett gedruckt) mit dem homologen EST Accession-Nummer AJ481815 (*H.vulgare* L.). Mit den eingezeichneten Primern (CACA...) wurden die Fragmente amplifiziert.

In Abbildung 13(d) ist erkennbar, dass das Fragment cP64M55_223 auf genomischer Basis etwa 800 bp größer ist als das cDNA-Fragment und daher Intron-Exon-Übergänge im genomischen Fragment vorliegen müssen, die auf den Polymorphismus allerdings keinen Einfluss besitzen.



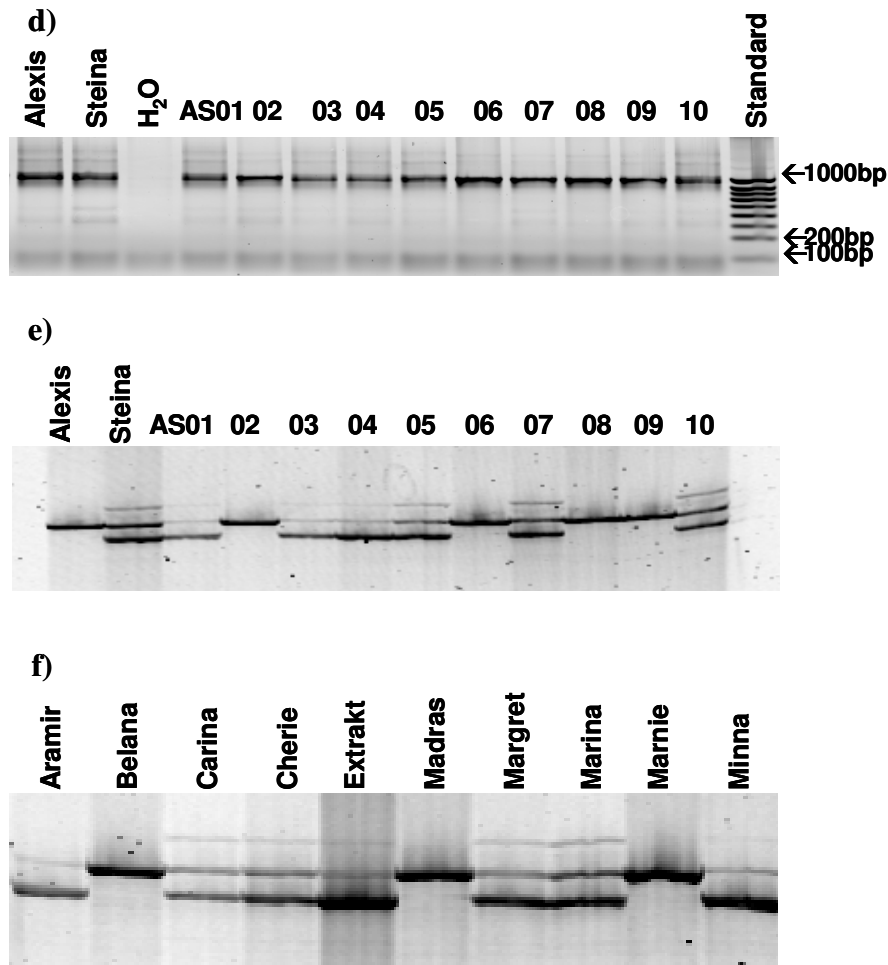


Abbildung 13: Entwicklung des CAPS-Markers CAPS12_MQ/5H aus dem Expressionsmarker cP64M55_223

- cDNA-AFLP-Profil des TDF cP64M55_223. Gezeigt sind Alexis, Steina und ausgewählte Linien der Population.
- PCR-Produkte der abgeleiteten Primer, welche die *PstI*-Schnittstelle umschlossen, auf cDNA-Ebene
- PstI*-Verdau der Population auf cDNA-Ebene
- PCR-Produkte der Population auf genomischer Ebene
- PstI*-Verdau der Population auf genomischer Ebene
- PstI*-Verdau der ausgewählten Sorten auf genomischer Ebene

Da der oben beschriebene Ansatz zur Detektion von Polymorphismen in der Restriktionsschnittstelle für das Fragment cP68M59_571, einem TDF in dem QTL-Hot Spot auf Chromosom 5H, keinen Erfolg zeigte, wurde eine andere Strategie zur Markerentwicklung angewandt. Die Sequenz des Fragmentes cP68M59_571 wurde mit dem homologen cDNA-Klon AK249221 abgeglichen. Der cDNA-Klon war mit 1346 bp Länge ca. 689 bp größer als das TDF und es bestand die Möglichkeit, die Sequenz des TDFs zu verlängern und so möglichst große Fragmente zu generieren. Die Chance auf eine SNP-Detektion konnte damit erhöht werden. Anhand der Sequenz des Klons

wurden zwei Primerpaare abgeleitet. Primerpaar 1 sollte ein Fragment auf cDNA-Ebene von 696 bp amplifizieren, Primerpaar 2 eines von 627 bp (Abbildung 14).

Die Primer wurden auf cDNA- und genomischer Ebene in einer Gradienten-PCR mit den Kreuzungseltern Alexis und Steina getestet und es konnte jeweils eine klar definierte Zielbande amplifiziert werden. Die Fragmente auf cDNA-Ebene stimmten mit der erwarteten Größe überein. Auf genomischer Ebene erzeugte das Primerpaar 1 Fragmente mit ca. 2000 bp Länge, die Fragmente generiert durch Primerpaar 2 waren ca. 2500 bp lang (Abbildung 15b). Die Fragmente, amplifiziert aus der genomischen DNA beider Kreuzungseltern, wurden mit Forward- und Reverse-Primer jeweils von beiden Seiten ansequenziert. Es zeigte sich, dass nur Teilsequenzen der Fragmente mit TDF und dem cDNA-Klon übereinstimmten und lange Intronsequenzen in den genomischen Fragmenten vorlagen. In den durch Primerpaar 1 generierten Fragmenten konnten keine SNPs zwischen den Kreuzungseltern detektiert werden. Die durch Primerpaar 2 erzeugten Fragmente wiesen jedoch in einer Intronsequenz einen SNP zwischen Alexis und Steina auf (Abbildung 15e).

Da nach einer Sequenzanalyse keine Restriktionsschnittstelle für ein spezifisches Enzym an diesem SNP detektiert werden konnte, wurden mit dem Programm PSQ Assay Design Primer für eine SNP-Analyse mit dem Pyrosequenzer entwickelt.

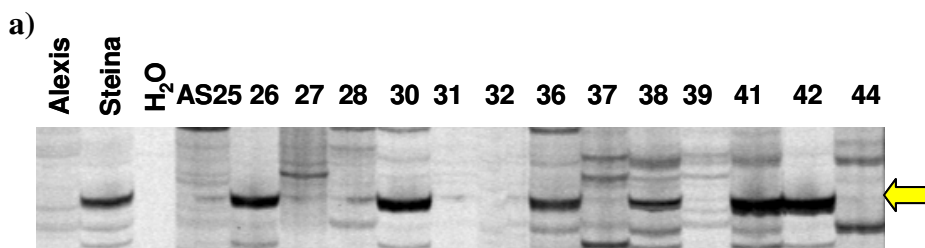
Die sich aus diesen Primern ergebenden Fragmente hatten eine Länge von 107 bp (Abbildung 15c). Mittels Pyrosequenzierung konnte dann der SNP in der Population und in einem Sortiment aus 40 Sommergerstensorten detektiert werden (Abbildung 15e).

```

1 GGCAGATTCTAACCCCTAAGTGTTCCCTCTCCACCCCTCCTCCCCTCATTGTAGCCGCCG
61 CCGCCACTTCTTCTGGCAACATCGCCAGATCCACCGCTCACCTCTGCCAGCGCAAGCC
121 CTTCCGGCTCCCAGCCAATCCCCACCGCCCTGACTCTCGAGACGGTGGTGTGAAGCC
181 TCACGGCCTTATCCCCATAGATCGGTCGCTCTGATGACCTCAACCCACCAAATCAC
241 GGGCTTCTTCCATCACGCCACCCCGCAGAAGCAGCCACTCTTAGCAGTCACGGCCGACG
301 TCCTAGTCTTAGCAGTCTCCGCCACGGCCACAGTGTCCCAACGATCGCGGCTTCATCGT
361 CTCCTCCCTGGAGAACGGCACGAAGCCGGAGTTTCGGGTTGGCGCTGCAGGCCGTCGAGTA
421 GGCGCGCTCCGCCGGCGAGTCACTCCGGAACGTACGGGGTCGAGCTCGAATTTGTGGCCA
481 CTTGGATTGGGATATGATGTAGGGATTGCGGAAAAGTGACCGATTCCATGCGTGCATGAGC
541 TTGAGGAGATGGGTGTGCTGGAGGACTCTGTCAAGATCCGATATTCGCTGTTCTCCCGGA
601 CGACGGAGACTACCAGGGTGGTCGCCGGCGTGCTGGGCGTCCCATTTCGAGGGTCCTGGCT
661 GGAAGGCGGCGTTGGCGGGAGTTCGTATTAGGAGAGAGGAAAAGGACGGGAAGAAAGAA
721 GCTTGGGCATGAGGGTTATTGGGTGGTGGTGACCTTCAAGTACCTGCCTCATGGCACCT
781 CACTCTACAGTCGTGGCAAGAGATACTGAACATAATCCCGACCCGTGACAACCTTTTTT
841 GGCCTTATCTCCATCTCAGAGATCTAGCTTCTATCAACAGATGGAAATTTATCGGACTGG
901 GCTGGGAAGATAATGGAGACTGCTACACTTGTTCCTTCGTTCCCTCCGGAGCAATAAAGAA
961 GATATGGAAGTTGGGTCTTCAATTGTATCACCCACACTTAGTATACACACGTGAATATAG
1021 TTACAAGTCAAATCATATATTGTGCTCATTTACAAATGTAATGTAGGACCAGTTAACTAT
1081 TAGTGATTGTAACATGTTTGACTAAGATGAAGCTTCATTGCACCTTTCATTCTCTTTATG
1141 TGCTCATTTTAGTAATAGTTACTAGATTCTAGGCTGGAGTTGTAAGTGGATGAAGCTTC
1201 ATTGTAAGTGGATTTGTAGTGGAGTTGAAGGCCGAAGTATTTATGTAGTGCATGTTTGT
1261 AAAGTTTCTGCAATGGTGCTTATTGCTTAAATGATCGGGACTATTTAATAGAATGTTTTT
1321 TTGTCGGAAAAAAAAAAAAAAAAAATAC

```

Abbildung 14: Das cDNA-AFLP-Fragment cP68M59_571 (fett gedruckt) mit dem homologen EST Accession-Nummer AK249221 (*H. vulgare* L.). Mit den eingezeichneten Primern (**AGATT...**; **GAGTT...**; **TGCTT...**) wurden die Fragmente für die Sequenzierung amplifiziert. Die rot markierte Sequenz (**GAGTT...**) wurde sowohl als Reverse-Primer für das Primerpaar 1, als auch als Forward Primer für das Primerpaar 2 genutzt. (Primerpaar 1: Forward-Primer: **AGATT...**, Reverse-Primer: **GAGTT...**), (Primerpaar 2: Forward-Primer: **GAGTT...**, Reverse-Primer: **TGCTT...**).



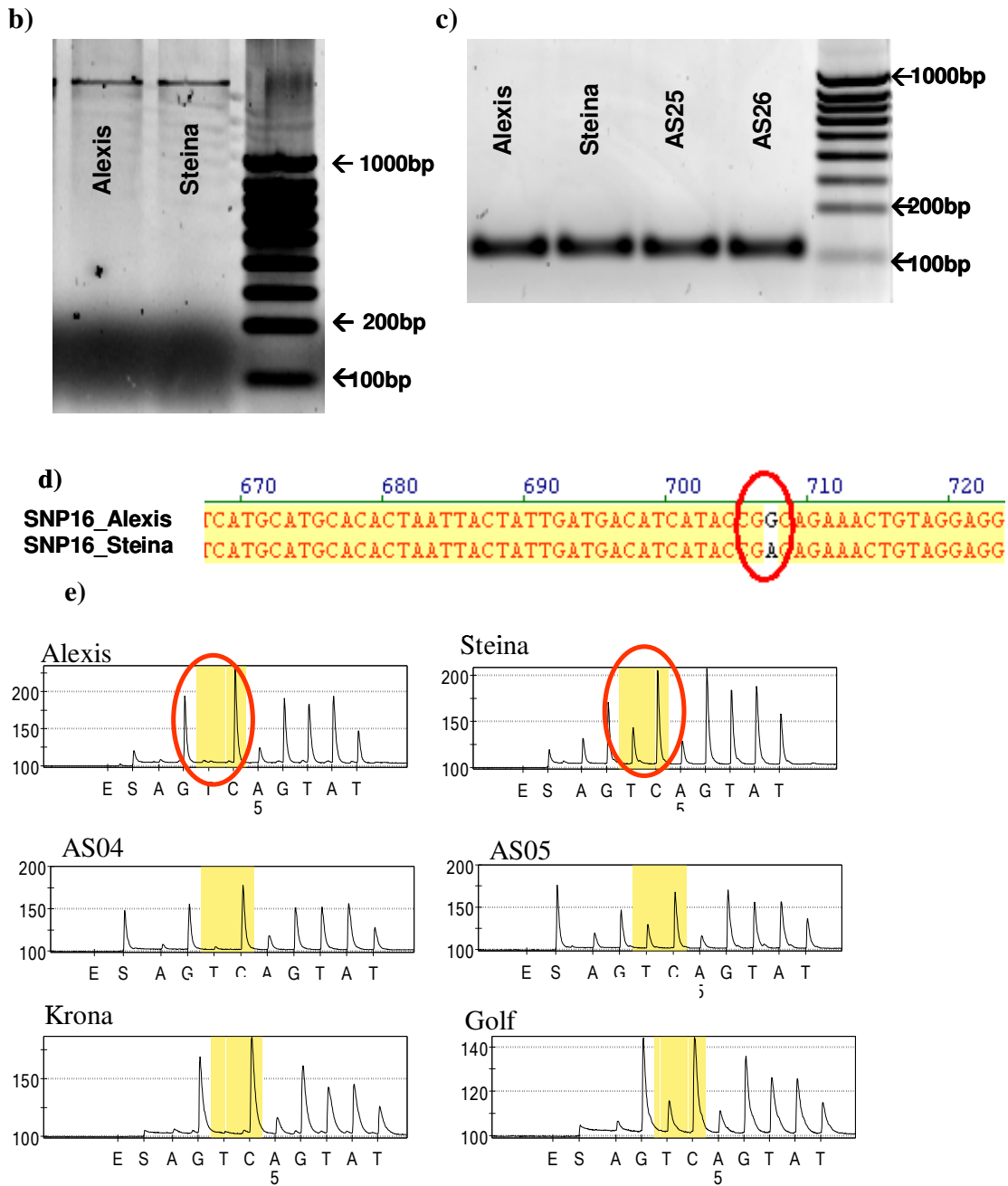


Abbildung 15: Entwicklung des SNP-Markers SNP16_MQ/5H aus dem Expressionsmarker cP68M59_571.

a) cDNA-AFLP-Profil des TDF cP68M59_571. Gezeigt sind Alexis, Steina und ausgewählte Linien der Population.

b) PCR-Produkte der abgeleiteten Primer auf DNA-Ebene

c) Für die Pyrosequenzierungs-Reaktion generiertes Fragment, in welchem der SNP enthalten ist.

d) Detektierter SNP zwischen Alexis und Steina im nicht codierenden Bereich des mit abgeleiteten Primern generierten Fragmentes.

e) Auswertbares Pyrosequenzierungsprofil des abgeleiteten SNP-Markers SNP16_MQ/5H für Alexis, Steina, Linien der Population und Gerstensorten.

Die beiden abgeleiteten Marker wurden auf genomischer Ebene in die entsprechenden QTL-Intervalle der Alexis \times Steina Population rückkartiert und waren in denselben genomischen Regionen wie die ursprünglichen Expressionsmarker lokalisiert.

Die Einsetzbarkeit als Selektionsmarker für Parameter der Malzqualität wurde in einem Sortiment von 40 Sommergerstensorten validiert (Abbildung 16). Für diese lagen Malzqualitätsdaten aus vier Umwelten vor.

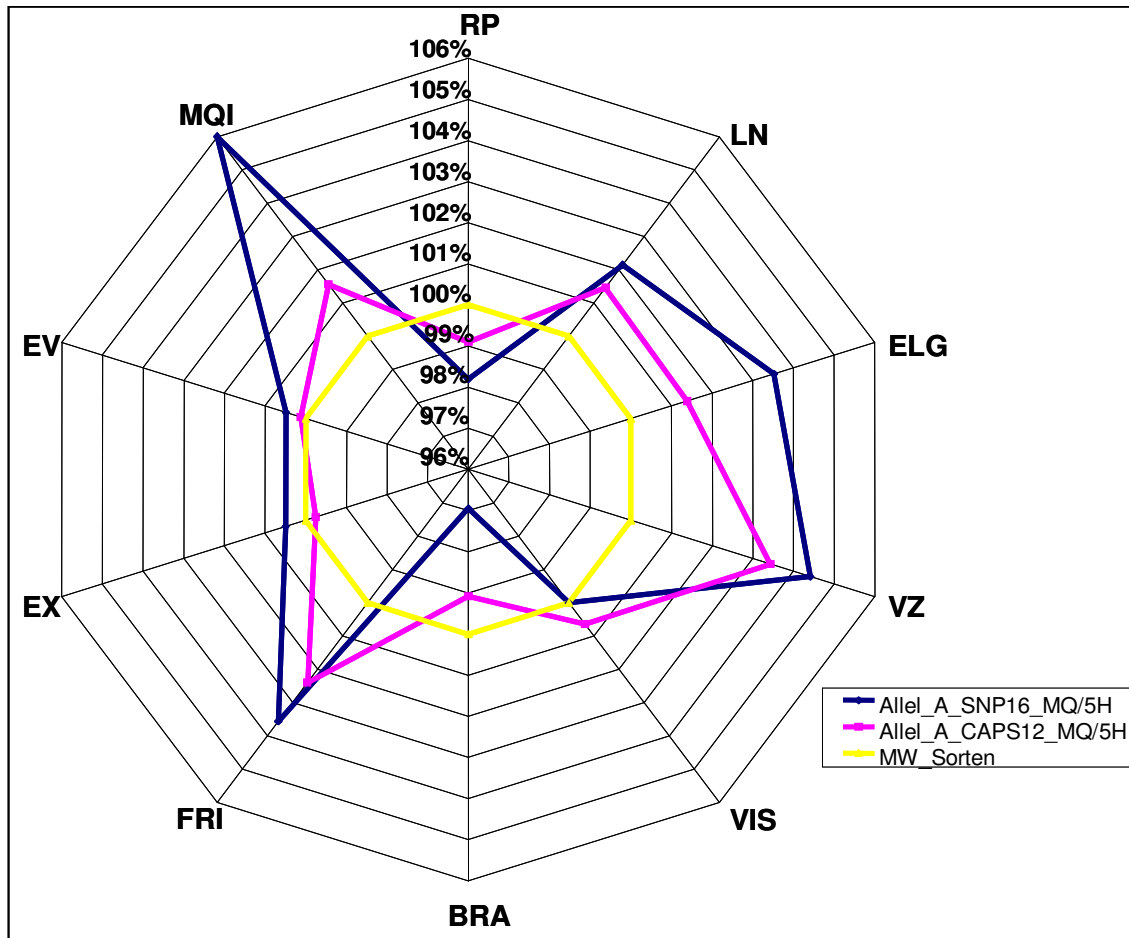


Abbildung 16: Selektionserfolg der abgeleiteten Marker CAPS12_MQ/5H und SNP16_MQ/5H für die einzelnen Malzqualitätsparameter innerhalb eines Sommergerstensortiments. Im Netzdiagramm gezeigt ist die relative Veränderung des Mittelwertes der, mit den jeweils günstigen Allelen der abgeleiteten Marker, selektierten Sorten im Vergleich zum Mittelwert der Sorten (MW_Sorten). Die Mittelwerte basieren auf den Malzqualitätsdaten von 40 Sommergerstensorten aus vier Umwelten. Abkürzungen siehe Tabelle 13.

Wurden diese Sorten mit dem SNP-Marker SNP16_MQ/5H selektiert, wie das Netzdiagramm in Abbildung 16 veranschaulicht, zeigten sich Korrelationen zu allen Malzqualitätsparametern. Vor allem für die VZ45°C, die proteolytischen und cytolytischen Parameter sowie für den MQI wurden relative Verbesserungen bis zu 6% im Vergleich zum Mittelwert aller Sorten erreicht, wenn mit dem positiven Allel

selektiert wurde. Die Mittelwertvergleiche zwischen den Linien, welche jeweils die beiden unterschiedlichen Allele trugen, (Scheffe $\alpha=0,05$) waren für alle Parameter signifikant (Tabelle 24).

Die Sorten, die das positive Allel des CAPS-Markers CAPS12_MQ/5H trugen, zeigten vor allem in den proteolytischen Parametern sowie der VZ45°C, dem MQI und dem Friabilimeterwert eine bessere Ausprägung als der Mittelwert der Sorten. Mittelwertvergleiche nach Scheffe zeigten signifikante Unterschiede zwischen den selektierten Sorten für die Parameter VZ45 °C, Eiweißlösungsgrad, Gehalt an löslichem Stickstoff und Friabilimeter.

Tabelle 24: Ergebnisse der Mittelwertvergleiche zwischen den selektierten Sorten. Verschiedene Buchstaben weisen auf signifikante Unterschiede nach einem multiplen Mittelwertvergleich hin (Scheffe-Test, $p \leq 0,05$). Abkürzungen siehe Tabelle 4.

	VZ	RP	LN	ELG	FRI	BRA	VIS	EX	EV	MQI
SNP16_MQ/5H_A	44,8 ^a	10,9 ^a	763 ^a	44,1 ^a	72,6 ^a	127 ^a	1,55 ^a	80,9 ^a	82,8 ^a	6,7 ^a
SNP16_MQ/5H_B	39,7 ^b	11,4 ^b	722 ^b	40,1 ^b	65,5 ^b	138 ^b	1,56 ^b	80,0 ^b	81,7 ^b	5,4 ^b
CAPS12_MQ/5H_A	45,2 ^a	11,0	765 ^a	43,8 ^a	72,6 ^a	129	1,56	80,5	82,6	6,5
CAPS12_MQ/5H_B	42,6 ^b	11,1	747 ^b	42,7 ^b	69,9 ^b	131	1,55	80,7	82,5	6,3

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals eine Kombination von Transkriptomanalyse mittels cDNA-AFLP und QTL-Kartierung für die Malzqualität durchgeführt, mit dem Ziel exprimierte Gene während des Mälzungsprozesses zu detektieren, diese mit der phänotypischen Variation innerhalb der Population zu korrelieren und Selektionsmarker auf genomischer Ebene für die Malzqualität zu entwickeln.

Im folgenden wird die Bedeutung der erhaltenen Ergebnisse im Zusammenhang mit bereits veröffentlichten Daten diskutiert. Sie werden auf ihren Nutzen für die Pflanzenzüchtung analysiert und die Verwendung der Ergebnisse als Basis für weitergehende vertiefende Untersuchungen um Genfunktionen und Regulationsmechanismen im Einzelnen aufzuklären, wird in einem Ausblick diskutiert.

4.1 Phänotypische Daten der Population

Die Linien der Population zeigten für alle untersuchten Malzqualitätsparameter eine kontinuierliche Häufigkeitsverteilung, die charakteristisch für eine quantitative Vererbung ist. Dies deutet darauf hin, dass die Ausprägung der Malzqualität auf mehrere QTLs mit vergleichsweise geringen Effekten zurückzuführen ist. Wie die Normalverteilungskurven ebenfalls zeigten, konnten Transgressionen in beide Richtungen in der Population bei allen untersuchten Parametern festgestellt werden. Es traten Allele beider Elternlinien mit positiven Wirkungen gemeinsam auf und es entstanden so Rekombinante, in denen sich positive Allele beider Eltern vereinten. Dies ist umso wahrscheinlicher, da beide Eltern ein hohes Malzqualitätsniveau besitzen.

Eine kontinuierliche Häufigkeitsverteilung der Malzqualitätsparameter sowie eine transgressive Spaltung der Linien konnten auch in zahlreichen weiteren Studien bezüglich Malzqualität (Mather et al. 1997, Herz 2000, Molina-Cano et al. 2007, Von Korff et al. 2008) beobachtet werden.

In weiten Kreuzungen, die auf Sorten mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund beruhen, wurden deutliche Verschlechterungen der Malzqualität innerhalb der Populationen festgestellt (Herz 2000, Marquez-Cedillo et al. 2000). Weite Kreuzungen scheinen die Balance der qualitätsbeeinflussenden Gene daher weitgehend zu

zerstören (Hartl et al. 2000). In dieser Population konnte dagegen keine allgemeine Verschlechterung der Malzqualität durch Neukombination oder Aufbrechen günstiger Genkombinationen beobachtet werden. Die Malzqualität der Population lag insgesamt auf einem hohen Niveau.

Die ermittelten Korrelationskoeffizienten zwischen den Umwelten geben Hinweise auf die Umweltabhängigkeit der einzelnen Parameter. Für die Merkmale VZ45°C, löslicher Stickstoff, Eiweißlösungsgrad und Malzqualitätsindex lagen die Korrelationen alle im signifikanten bis hochsignifikanten Bereich. Dies spiegelt eine gute Reproduzierbarkeit der Merkmalerfassung über die Umwelten wieder und weist auf stabile genetische Effekte hin. Bei den übrigen Parametern Rohproteingehalt, Viskosität, Brabender, Friabilimeter, Endvergärungsgrad und Extraktgehalt war ein Großteil der Umwelten ebenfalls signifikant bis hochsignifikant korreliert, so dass auch hier auf eine zuverlässige Phänotypisierung geschlossen werden kann. Allerdings traten bei allen genannten Merkmalen Umwelten auf, die auf einem sehr niedrigen Niveau bzw. gar nicht korreliert waren (Tabelle 14). Dies kann zum einen auf die relativ geringe Variation für diese Merkmale bei den vorliegenden Kreuzungseltern zurückgeführt werden, zum anderen auf eine relativ große Umweltwirkung. Grundsätzlich zeigen die Korrelationsdaten der Umwelten die begrenzte Aussagekraft einzelner bzw. weniger Umwelten zur Schätzung der Malzqualität. Die Korrelationen zwischen den Umwelten weisen aber insgesamt gute Übereinstimmungen mit den langjährigen Versuchen der LFL auf (Abbildung 3).

Es ergaben sich in der vorliegenden Population, mit Ausnahme des Extraktgehaltes und dem Endvergärungsgrad, die nicht signifikant korreliert waren, hochsignifikante bis signifikante Korrelationen zwischen allen Parametern. Vor allem die proteolytischen Parameter und die VZ45°C waren signifikant mit den übrigen Merkmalen assoziiert (Tabelle 16). Dies ist zu erklären, da die Parameter als Indikatoren für die Aktivitäten diverser Enzyme dienen, die wiederum durch komplexe Stoffwechselnetzwerke und Signaltransduktionen biochemisch und physiologisch zusammenhängen. Eine hohe Intensität der Cytolyse und Proteolyse determiniert die Amylolyse dadurch, dass eine schnelle Auflösung der Verbindung zwischen Zellwand und der Proteinmatrix den stärkeabbauenden Enzymen einen schnellen Zugang zu ihren Substraten ermöglicht.

Signifikante Korrelationen zwischen den verschiedenen Malzqualitätsparametern wurden in zahlreichen Arbeiten beobachtet (Molina-Cano et al. 1997, Herz 2000, Edney et al. 2004, Moralejo et al. 2004, Molina-Cano et al. 2007, Von Korff et al. 2008).

Wenn Merkmale zusätzlich zu einer engen phänotypischen Korrelation von überlappenden QTLs beeinflusst werden, stellt sich die Frage, ob dieser Zusammenhang durch pleiotrope Effekte oder sehr enge Kopplung verursacht wird.

Bei Pleiotropie werden mehrere Merkmale von einem Gen beeinflusst, bei Kopplung liegen unterschiedlich eng gekoppelte Loci für verschiedene Merkmale vor (Falconer 1984). Für eine Aufklärung der Einflüsse ist eine QTL-Analyse alleine meist nicht ausreichend. Dieses erfordert weiterführende Untersuchungen, wie z.B. die Analyse von überlappenden Nah Isogenen Linien (NILs) (Paterson et al. 1990), vergleichender Untersuchungen zwischen Einkornrandsch-Nachkommen und DH-Linien (Powell et al. 1985, Thomas et al. 1991) oder einer Feinkartierung und einem „map based cloning“ Ansatz.

Bei den agronomischen Eigenschaften konnte nur bei dem Merkmal Ährenschieben eine kontinuierliche Verteilung festgestellt werden, die auf eine quantitative Vererbung schließen lässt. Obwohl die Eltern keine Differenzierung bezüglich Ährenschieben zeigten, wurde in der Population eine hinreichende Variation detektiert (Abbildung 7). Bei dem Merkmal Wuchshöhe kristallisierten sich zwei Maxima in der Verteilung heraus, die durch die Anwesenheit des von Alexis vererbten *denso*-Gens verursacht wurden (Laurie et al. 1993, Hellewell et al. 2000). Die Verteilung für die Lagerneigung war stark linksschief, was zum einen auf die starken Umwelteinflüsse zurückzuführen ist, zum anderen aber auch auf die Anwesenheit des *denso*-Verzweigungsgens. Transgressionen traten bei allen Merkmalen in beide Richtungen auf, was auch hier auf zusätzliche positive Allele beider Eltern schließen lässt.

Die hohen Heritabilitäten bei den Merkmalen Wuchshöhe und Ährenschieben weisen sowohl auf eine gute Reproduzierbarkeit der Daten als auch auf wenige beteiligte Gene hin. Die im Gegensatz dazu niedrigere Heritabilität für Lagerneigung kann vor allem auf eine sehr hohe Umweltbeeinflussung des Merkmals zurückgeführt werden.

In der vorliegenden Population wurden hochsignifikante negative Korrelationen zwischen dem Zeitpunkt des Ährenschiebens und den Merkmalen Wuchshöhe und Lagerneigung detektiert, wohingegen Wuchshöhe und Lagerneigung untereinander

hochsignifikant positiv korreliert waren. Die enge Korrelation zwischen der Wuchshöhe und der Lagerneigung kann sicher auf physiologische Zusammenhänge, wie der Gewebestabilität, zurückgeführt werden. Lange Pflanzen neigen aus diesem Grund eher dazu ins Lager zu gehen. Hier können pleiotrope Effekte eine große Rolle spielen. Von ähnlichen Korrelationen in unterschiedlichen Gerstenpopulationen wurde in zahlreichen weiteren Arbeiten berichtet (Powell et al. 1985, Thomas et al. 1991, Backes et al. 1995, Yin et al. 1999, Herz 2000, Li et al. 2005, Von Korff et al. 2006). Interessant waren die hohen Korrelationen zwischen den agronomischen Merkmalen und dem Qualitätsparametern Rohproteingehalt, Gehalt an löslichem Stickstoff sowie dem Extraktgehalt. In der QTL-Analyse zeigte sich, dass diese Korrelationen genetische Ursachen haben, da wichtige QTLs für diese Merkmale am selben Locus (*denso*-Locus, 3H) detektiert werden konnten (Kapitel 4.3.2.).

4.2 cDNA-AFLP-Analyse und molekulare Kartierung der Population

In der vorliegenden Studie wird erstmals über die direkte Kartierung von, durch spezifische Induktion, generierten cDNA-AFLP-Markern in einer Gerstenpopulation berichtet. Es sollte untersucht werden, inwieweit die Kleinmälzung eine Möglichkeit zur Induktion der Genexpression für eine nachfolgende Transkriptomanalyse darstellt und inwieweit es möglich ist, differentielle Transkripte, die mittels cDNA-AFLP-Technik generiert wurden, in eine Gerstenkopplungskarte zu integrieren. Insgesamt zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass die Induktion der Genexpression durch den streng kontrollierten Prozess der Kleinmälzung eine Möglichkeit zur Generierung von spezifischen Transkriptionsprofilen darstellt. Spaltende Transkripte konnten zusammen mit genomischen Markerdaten kartiert werden (Abbildung 8).

Die Probenahme zum Zeitpunkt 24 h nach Beginn der Vermälzung für die Durchführung der Transkriptomanalyse wurde aufgrund von Expressionsanalysen der Grenz-Dextrinase und der Araboxylanase, zwei Schlüsselenzymen der Vermälzung, mittels Real Time PCR ausgewählt. Aus den Ergebnissen wurde abgeleitet, dass in diesem Zeitraum starke Veränderungen in der Genexpression stattfinden (Herz und Mikolajewski pers. Mitteilung). Dies wurde auch in einer Studie zur Expressionsanalyse während der Vermälzung mittels SAGE (White et al. 2006) dargestellt.

Die cDNA-AFLP-Marker wurden in der vorliegenden Arbeit, wie auch bei Brugmans et al. (2002), Fernandez del Carmen et al. (2007) und Ritter et al. (2008) qualitativ ausgewertet. Der größte Teil der ausgewerteten Transkriptommarker in der vorliegenden Arbeit zeigte einen klaren Vorhanden/ Nicht-Vorhanden (striker 0/1) Polymorphismus. Dies ist bereits ein Hinweis darauf, dass nicht differentiell exprimierte Gene, sondern Sequenzunterschiede in den Restriktionsschnittstellen und/ oder Primerbindungsstellen der Transkripte für die detektierten Polymorphismen verantwortlich waren. Auch in den Untersuchungen von Brugmans et al. (2002) und Fernandez del Carmen et al. (2007) zeigte nur ein sehr geringer Teil der polymorphen Transkripte eine quantitative Variation ($< 1\%$).

Zur Identifizierung von Genen, die einen Einfluss auf die Malzqualität haben, können grundsätzlich zwei Hypothesen zugrunde gelegt werden. In einem ersten Ansatz wird angenommen, dass in einem Genotyp mit guter Malzqualität bestimmte Gene stärker oder schwächer exprimiert werden als in einem Genotyp mit schlechter Malzqualität („functional genomics“-Ansatz). Der zweite Ansatz beruht auf der Hypothese, dass ein Genotyp mit guter Malzqualität andere Allele für relevante Gene besitzt, als ein Genotyp mit schlechter Malzqualität („structural genomics“-Ansatz). Unterschiede im Phänotyp können daher neben der differentiellen Genexpression auch allelische Unterschiede, SNPs oder INDELS (Insertions/Deletions), in den Transkripten als Ursache haben.

Mit der Methode der Transkriptomkartierung war es möglich, die zum Zeitpunkt 24 h nach Beginn der Vermälzung exprimierten Gene zu detektieren und allelische Unterschiede in diesen sichtbar zu machen. Diese wurden anschließend in der QTL-Kartierung mit der phänotypischen Variation assoziiert. Damit schließt diese Art der Auswertung eine Lücke zu den auf Hybridisierung beruhenden Genexpressionsanalysen. Mit dieser Methode ist meist keine Korrelation zwischen allelischen Unterschieden in den exprimierten Kandidatengen und der Aufspaltung des phänotypischen Merkmals möglich. Für die Entwicklung molekularer Selektionsmarker auf DNA-Ebene ist die qualitative Auswertung von großem Vorteil, da es möglich ist, die verursachenden Sequenzunterschiede direkt für die Markerableitung zu nutzen.

Das Grundgerüst der genetischen Karte wurde mittels genomischer AFLP- und Mikrosatellitenmarker erstellt. Da Mikrosatelliten locuspezifisch sind, konnte anhand dieser eine genaue Zuordnung aller Kopplungsgruppen zu den Chromosomen durchgeführt werden. Die genomischen AFLP-Marker haben den großen Vorteil, dass sie durch ihren hohen Polymorphiegrad eine schnelle Absättigung der Kopplungsgruppen ermöglichen. Mittlerweile sind auf Hybridisierung beruhende Markersysteme, wie die DArTs (Diversity Arrays Technology, Jaccoud et al. 2001) entwickelt worden, mit denen innerhalb kürzester Zeit die Genotypisierung von Kartierungspopulationen automatisiert durchgeführt werden kann. Erste Untersuchungen unter anderem in Gerste zeigen, dass diese Technologie, bezüglich Qualität und Informationsgehalt der Marker, den bisherigen für Genotypisierungen genutzten Markersystemen vergleichbar ist (Wenzl et al. 2006).

Der Polymorphiegrad der getesteten Mikrosatelliten betrug 33,5% und war damit niedriger als in vergleichbaren Studien (Pillen et al. 2000, Thiel et al. 2003). Die gescreenten SNP-Marker zeigten einen noch niedrigeren Polymorphiegrad von 17,5%. Eine Ursache liegt sicher darin, dass diese Marker aus ESTs, also exprimierten Genen, generiert wurden, welche einem starken Selektionsdruck unterliegen. Die so entwickelten Marker zeigen allgemein einen geringeren Polymorphiegrad, als Marker entwickelt aus anonymen Genomsequenzen (Varshney et al. 2006). Alexis und Steina zeigten in vorausgehenden Untersuchungen außerdem eine hohe genetische Ähnlichkeit von 84,5% (Kipp 1998), was ebenfalls ein Grund für diese niedrigen Polymorphiegrade darstellen kann. Beides sind europäische Sorten, die wiederum europäische Sorten bzw. Genotypen als Eltern haben und unter ähnlichen Bedingungen selektiert wurden. Die genetische Basis beider Sorten ist daher relativ eng. Kota et al. (2007) fanden in der, ebenfalls aus Elitesorten erstellten, Igr1 × Franka Population für dieselben SNP-Marker (GBS) ebenfalls nur einen Polymorphiegrad von 17%. Populationen mit Wildgersteneltern zeigten dagegen erwartungsgemäß, aufgrund ihrer geringeren Verwandtschaft ein höheres Ausmaß an Polymorphie.

Der Umfang der genetischen Karte betrug 1138 cM. Dieser liegt in einer vergleichbaren Größenordnung von in anderen Studien erstellten Chromosomenkarten (Ramsey et al. 2000, 1173 cM; Barr et al. 2003, 1330 cM; Varshney et al. 2007, 1068 cM; Cuesta Marcos et al. 2008, 1164 cM). Trotzdem konnten im Vergleich zu den veröffentlichten Karten von Ramsey et al. (2000) und Varshney et al. (2007) einzelne

Chomosomenfragmente nicht kartiert werden. So fehlten auf Chromosom 3H und 4H jeweils die Abschnitte BIN 1-4. Chromosom 2H und teilweise auch 3H zeigten nur eine unzureichende Abdeckung mit Mikrosatelliten. Dies lässt auf stark konservierte Genomregionen in der Population schließen, die nicht erfasst werden konnten. Loci mit einem großen Effekt auf die Malzqualität sind in diesen Regionen aus diesem Grund aber auch nicht zu erwarten.

Die hier erstellte Chromosomenkarte der Population erreichte jedoch insgesamt eine gute Abdeckung des Genoms für die polymorphen Bereiche, so dass eine fundierte QTL-Analyse möglich war. Für die QTL-Verrechnung wurde die Markerdichte in einigen Kopplungsgruppen mit hoher Anzahl an Markern reduziert, um den Genotyp der Linien im Abstand von 5-10 cM zu erfassen. Die Verrechnung wurde letztlich mit einem Kartengerüst von 164 Markern durchgeführt. Die QTL-Detektion hängt mit der Güte der Marker zusammen, untereinander eng gekoppelte Marker bringen keine zusätzliche Information (Kearsey 1998).

4.3 QTL-Analyse

Die in dieser Arbeit vorgestellte Transkriptomkartierung und die anschließende QTL-Analyse für Parameter der Malzqualität wurden an einer 132 Linien umfassenden DH-Population, hervorgegangen aus einer Alexis × Steina Kreuzung, durchgeführt. Beide Eltern sind Elitebraugersten, die allerdings unterschiedliche Qualitätstypen repräsentieren. Die genetische Distanz dieser Sorten ist relativ klein, was auch den geringen Polymorphiegrad aller getesteten SSR und SNPs erklärt. Für die praktische Anwendung der Ergebnisse dieser Studie ist die Auswahl der Eltern jedoch von großem Vorteil. In Populationen, entstanden aus weiten Kreuzungen, bei denen ein Elter keine Malzqualität zeigt, ist zwar die Chance höher mehr QTLs zu detektieren, Untersuchungen haben aber gezeigt, dass die so identifizierten QTLs in Elitematerial oft nicht wirksam sind, da diese Allele bereits fixiert vorliegen (Rae et al. 2006, Molina-Cano et al. 2007). Ein weiterer entscheidender Vorteil von Elitematerial als Populationseletern ist, dass bei einer möglichen Nutzung dieser QTLs in Züchtungsprogrammen mittels markergestützter Selektion keine Gefahr der Übertragung unerwünschter Eigenschaften („Linkage drag“) gegeben ist, wie etwa bei der Verwendung exotischer Quellen.

Die Korrelationen der phänotypischen Daten haben den großen Umwelteinfluss auf die Parameter der Malzqualität demonstriert. Für die QTL-Analyse zur Malzqualität lagen in der vorliegenden Studie Daten aus sieben bzw. acht Umwelten vor. Dies stellt eine sehr gute Basis für die QTL-Analyse dar. Die Zahl der Umwelten in dieser Studie lag damit wesentlich höher als die bei vergleichbaren Arbeiten, in denen zwischen zwei und sechs Umwelten für die Analysen der Malzqualität zur Verfügung standen (Mather et al. 1997, Molina-Cano et al. 2007).

Da die Kleinmälzung und die anschließende Analyse der Qualitätsparameter im Labor extrem aufwendige und teure Verfahren darstellen und die Kapazitäten in der Kleinmälzungsanlage begrenzt sind, wurden die Wiederholungen der einzelnen Umwelten zugunsten der Analyse mehrerer Umwelten gepoolt, bzw. nur eine der Wiederholungen vermälzt. Da nicht die Zahl der Wiederholungen in den Umwelten, sondern die Anzahl der Umwelten für die QTL-Analyse von Bedeutung ist (Knapp et al. 1990), wurde diese Maßnahme auch in den meisten der in der Literatur beschriebenen Studien zur QTL-Analyse der Malzqualität durchgeführt (Oziel et al. 1996, Marquez-Cedillo et al. 2000, Panozzo et al. 2007).

Die QTL-Analyse wurde mit dem Programm Multi QTL Vers. 2.5. (Korol et al. 2005) durchgeführt. Die in dieser Arbeit dargestellten QTLs wurden mit der Funktion Multiple Intervall Mapping (MIM) und der MULTIPLE ENVIRONMENT OPTION detektiert. Mit Hilfe dieser Prozedur kann die Varianz zwischen den Umwelten mit in die Analyse einbezogen werden. Bei einem Merkmal wie der Malzqualität, die in hohem Maße von der Umwelt beeinflusst wird, führt dies dazu, dass die erklärte phänotypische Varianz durch die einzelnen QTLs im Vergleich zu Studien, die mit einfachen Mittelwerten oder Einzelumwelten rechnen, geringer ist, letztendlich wird die Aussagekraft und Präzision der Untersuchung aber erhöht (Korol et al. 2005).

Sowohl für die geringe insgesamt erklärte phänotypische Varianz einzelner Merkmale als auch für die Tatsache, dass bei den Merkmalen Viskosität, Endvergärungsgrad und Alpha-Amylaseaktivität transgressive Linien in beide Richtungen innerhalb der Population auftraten, in der weiteren Analyse aber nur QTLs detektiert wurden, bei denen das positive Allel von Alexis vererbt wurde, gibt es mehrere mögliche Gründe.

Die Ausprägung der Malzqualität wird, wie erwähnt, stark durch Umwelteffekte beeinflusst. Außerdem zeigten die Eltern keine große Variation bezüglich dieser Merkmale, was ebenso einen Einfluss auf die Detektierbarkeit möglicher QTLs hat. Für Merkmale mit mittlerer bis geringer Heritabilität, wie im vorliegenden Fall, sinkt damit die Wahrscheinlichkeit QTLs zuverlässig zu identifizieren, vor allem in kleinen Populationen und bei QTLs mit geringen Effekten (Melchinger et al. 1998). Insgesamt ist jedoch keine restlose Erklärung möglich. Vermutlich werden die Merkmale durch zusätzliche QTLs beeinflusst, die in der vorliegenden Arbeit, aufgrund der oben genannten Gründe nicht erfasst werden konnten. Dennoch stimmt die in dieser QTL-Analyse detektierte insgesamt erklärte phänotypische Varianz für die einzelnen Malzqualitätsparameter gut mit den Ergebnissen der Varianzkomponentenanalyse der einzelnen Parameter überein (Abbildung 3).

Die in dieser Arbeit detektierten QTLs wurden mit anderen Studien zur QTL-Kartierung der Malzqualität und agronomischer Merkmale verglichen. Weltweit wird eine große Zahl unterschiedlicher Malzqualitätsparameter zur Schätzung der Malzqualität erhoben. Es wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, unterschiedliche Merkmale gemäß ihrer Ähnlichkeit zuzuordnen. So wurde beispielsweise der Endvergärungsgrad mit der Fermentabilität verglichen, da beide Parameter die amylolytischen Fähigkeiten des Malzes beschreiben. Aufgrund von unterschiedlichen Markern und Markersystemen, die in den verschiedenen Kartierungsstudien genutzt wurden, konnte eine Gegenüberstellung auch nicht immer direkt stattfinden, sondern wurde über Kartenvergleich, wenn die Möglichkeit bestand über die „BIN MAP“ der Gerste, durchgeführt (Kleinhofs und Graner 2000).

Chromosom 1H

Auf Chromosom 1H konnten QTLs für alle erhobenen Malzqualitätsmerkmale, mit Ausnahme des Rohproteingehaltes, in der Region der Bmac90/Bmag211-Loci (BIN 7) detektiert werden. In diesem Bereich wurden bereits in verschiedenen Populationen QTLs für Malzqualität lokalisiert. Panozzo et al. (2007) identifizierten hier in einer Alexis × Sloop Population Haupt-QTLs für Extraktgehalt, Diastatische Kraft, einem Merkmal, das die Alpha- und Beta-Amylaseaktivität repräsentiert, Alpha-Amylaseaktivität, freien Aminosäuregehalt, der mit dem Gehalt an löslichem Stickstoff

vergleichbar ist, und Viskosität, wobei die positiven Allele, ebenso wie in der vorliegenden Alexis × Steina Population, von Alexis vererbt wurden. Auch in zwei AB-QTL Kartierungspopulationen, Brenda × HS213 (*H. spontaneum*) und Scarlett × ISR42-8 (*H. spontaneum*), wurden in dieser Region Malzqualitäts-QTLs, vor allem für cytolytische Parameter, wie den Friabilimeter gefunden (Li et al. 2005, Von Korff et al. 2008). Marquez-Cedillo et al. (2000) und Edney et al. (2004) detektierten in der Harrington × Morex Population ebenfalls in diesem Bereich QTLs für Eiweißlösungsgrad, Diastatische Kraft und Friabilimeter. Transkriptommarker konnten in die QTL-Region auf Chromosom 1H nicht integriert werden und bisher wurde in der Literatur auch noch nicht über Kandidatengene, die einen Einfluß auf die Malzqualität in dieser Genomregion zeigen könnten, berichtet. Am *Hordein*-Locus, einer Region auf Chromosom 1H, in der ebenfalls in vielen Kartierungspopulationen Malzqualitäts-QTLs gefunden wurden, konnte im vorliegenden Pflanzenmaterial kein QTL identifiziert werden. Diese Region könnte in Elitesorten bereits fixiert vorliegen.

Chromosom 2H

Auf Chromosom 2H wurden QTLs für Hartongindex, Viskosität, Malzqualitätsindex und Alpha-Amylaseaktivität im Markerintervall gP68M52_158-gE32M47_324 detektiert. Alle positiven Allele kamen dabei von Alexis. Da auf dem kurzen Arm von Chromosom 2H nur ein Mikrosatellit kartierte, konnte ein Vergleich in dieser Arbeit mit anderen QTL-Karten nur annäherungsweise erfolgen. Der *Beta-Amylase2*-Locus liegt, circa 50 cM vom Mikrosatellit Bmag134 entfernt, in der Centromerregion und ist daher wahrscheinlich nicht für die Malzqualitäts-QTLs auf diesem Chromosom verantwortlich. Ein wichtiger QTL für Extraktgehalt konnte in der Halbgeschwisterpopulation Alexis × Sloop in Assoziation mit dem Markerintervall ABG14-cdo474 auf dem Chromosomenabschnitt ähnlich dem Vorliegenden identifiziert werden. Donor war, wie in der vorliegenden Arbeit, Alexis (Barr et al. 2003, Panozzo et al. 2007). In der AB-QTL Population Scarlett × ISR42-8 konnten ebenfalls in dieser Genomregion, in der zentral der Mikrosatellit Bmag125 (BIN11) lokalisiert ist, ein QTL für Alpha-Amylaseaktivität detektiert werden (Von Korff et al. 2008). Am *vrs1*-Locus (BIN10), der etwa 10-15 cM in Richtung Centromer lokalisiert ist, wurden von Marquez-Cedillo et al. (2000) QTLs für Rohproteingehalt, Gehalt an löslichem

Stickstoff und diastatische Kraft identifiziert. Der *vrs1*-Locus, der kürzlich kloniert wurde (Komatsuda et al. 2007) und für einen Transkriptionsfaktor codiert, ist für die Zwei- bzw. Sechszelligkeit der Gerste verantwortlich (Lundquist et al. 1997). Da die vorliegende Population aus rein zweizeiligen Gerstensorten aufgebaut wurde, ist es unwahrscheinlich, dass dieser Locus Einfluss auf die Malzqualität des vorliegenden Materials hat. Weitere qualitätsbeeinflussende Gene, welche für die Variation in der Malzqualität im vorliegenden Material verantwortlich sind, müssen auf diesem Chromosomenabschnitt liegen.

Chromosom 3H

Auf Chromosom 3H konnten zwei Regionen identifiziert werden, in denen QTLs für Malzqualität clustern. Ein „Hot Spot“, mit Haupt-QTLs für Rohprotein- und Extraktgehalt, Gehalt an löslichem Stickstoff sowie für alle untersuchten agronomischen Merkmale war am *denso*-Locus (BIN13) detektierbar. Für die Wuchshöhe war dies die einzige genomische Region, die Einfluss auf das Merkmal zeigte. Die hohen Korrelationen zwischen den agronomischen Merkmalen und einzelnen Malzqualitätsparametern (Tabelle A3) können daher auf einen genetischen Zusammenhang zurückgeführt werden. Das *denso*-Verzweigungsgen ist in vielen europäischen Gerstensorten vorhanden und im vorliegenden Pflanzenmaterial für die Kurzstrohigkeit des Elter Alexis verantwortlich. In einer Distanz von jeweils etwa 5 cM kartierten zwei Transkriptommarker in diese Region. Über den Einfluss des Zwergwuchs verursachenden Gens auf wichtige Eigenschaften der Gerste wurde bereits oft in der Literatur berichtet.

Einen Einfluss dieser Genomregion auf die Malzqualität fanden auch mehrere Autoren, die ebenfalls europäische Sommergerstenpopulationen untersuchten. Thomas et al. (1996) detektierten in dieser Region in einer Blenheim × E224/3 Kreuzung einen QTL für Rohproteingehalt, Bezan et al. (1997) fanden in einer Blenheim × Kym Population einen Haupt-QTL für Extraktgehalt in diesem Bereich und auch Swanston et al. (1999) identifizierten in der Derkado × B83 hier einen QTL für Fermentabilität, einem Merkmal vergleichbar mit Endvergärungsgrad. In der Halbgeschwisterpopulation Alexis × Sloop konnten hier ebenfalls QTLs für Diastatische Kraft und Viskosität (Panozzo et al. 2007) gefunden werden. Allerdings wurden bei Panozzo et al., genau

wie in der vorliegenden Alexis × Steina Population, die positiven Allele für die einzelnen Malzqualitätsparameter wechselnd von beiden Eltern vererbt. Alexis war in der vorliegenden Studie bei den Merkmalen Friabilimeter, Brabender, Viskosität, Rohprotein und Endvergärungsgrad Donor der positiven Allele, bei den Merkmalen VZ45°C, Gehalt an löslichem Stickstoff, Eiweißlösungsgrad, Extraktgehalt und Malzqualitätsindex besaß Alexis einen negativen Einfluss auf die Ausprägung. Daher sind diese QTLs für eine markergestützte Selektion in der praktischen Anwendung nicht nutzbar.

Erstmals kartiert wurde der Locus 1993 von Barua et al. und Laurie et al., die starke Assoziationen dieses Allels mit der Wuchshöhe und dem Ährenschieben identifizierten. Auch in Kreuzungen mit der Sorte „Blenheim“, die wie Alexis von Triumph abstammt und ebenfalls *denso*-Träger ist, wurden Haupt-QTLs für Wuchshöhe und Ährenschieben an diesem Locus detektiert (Bezant et al. 1996, Thomas et al. 1995, Powell et al. 1997). In allen Untersuchungen wurde von einer Assoziation zwischen kurzem Wuchs und späterem Ährenschieben berichtet.

Auch Yin et al. (1999) identifizierten hier in einer Prisma × Apex Population Haupt-QTLs für Wuchshöhe und Ährenschieben. Barr et al. (2003) konnten diesen Locus in der Alexis × Sloop Population mit Wuchshöhe assoziieren. Von Korff et al. (2006) detektierten in einer AB-Population mit dem Kreuzungselter Scarlett, einem *denso*-Träger, ebenfalls QTLs für Wuchshöhe, Ährenschieben und Lagerneigung in der entsprechenden Region auf Chromosom 3H.

Außer den erwähnten Eigenschaften zeigten in den oben genannten Studien zahlreiche weitere agronomische Merkmale eine starke Korrelation mit diesem Locus.

Die Frage, ob die unterschiedlichen agronomischen oder qualitätsbestimmenden Merkmale durch das Verzweigungsgen selbst, also durch Pleiotropie, beeinflusst werden oder ob eine enge Kopplung mehrerer Loci vorliegt, konnte noch nicht eindeutig geklärt werden. In vergleichenden Untersuchungen zwischen DH-Linien und Einkornrasmach-Nachkommen konnten Powell et al. (1985) nachweisen, dass durch zusätzliche Rekombinationsereignisse die Assoziation des Locus mit verschiedenen agronomischen Merkmalen gebrochen werden kann. Dies ließ auf Kopplung verschiedener Loci schließen. Thomas et al. (1995) verglichen ihre QTL-Studie mit amerikanischen Untersuchungen und fanden QTLs für bestimmte agronomische Merkmale auch in ähnlichen Regionen auf Chromosom 3H in den Populationen, die

kein Verzweigungsgen trugen. Sie schlussfolgerten, dass dies ein Hinweis auf Kopplung sein könnte, da das Verzweigungsgen nicht anwesend war. Im Gegensatz dazu kamen Hellewell et al. (2000), die Kreuzungen mit amerikanischen Sorten durchführten, welche das zu *denso* allelische Verzweigungsgen *sdw* trugen, aufgrund ihrer Ergebnisse zu dem Schluss, dass pleiotrope Effekte vorliegen müssen.

In aktuellen Studien konnte gezeigt werden, dass das *sdw1 (denso)*-Gen ortholog zum *sd1*-Gen in Reis ist (Zhang et al. 2005). *Sd1* wurde auf Chromosom 1 in Reis kartiert, einer syntenischen Region zu der Region auf Chromosom 3H, in welcher das *denso*-Gen lokalisiert ist. Beide sind mit gleichen RFLP-Markern gekoppelt. Zudem konnte durch vergleichende Analysen das *sd1* orthologe Gen in Gerste isoliert werden und dies zeigte sehr hohe Sequenzhomologien mit *sd1* (88,3%). Das Gen codiert für eine GA20-Oxidase, welche in die Gibberellin-Biosynthese involviert ist. Das die Verzweigung verursachende Allel beruht auf einer Mutation im Gen, die eine Blockierung bestimmter Schritte in der Gibberellinsäuresynthese und damit eine Reduzierung der Gibberellinmenge in diesem Genotyp zur Folge hat (Ashikari et al. 2002, Sasaki et al. 2002, Spielmeier et al. 2002, 2004). Gibberellinsäure ist als Phytohormon in eine Vielzahl von biologischen Prozessen involviert, unter anderem ist dieses Hormon auch wichtigster Induktor der hydrolytischen Enzyme, die während der Keimung und Mälzung für den Abbau der Speicherstoffe sorgen (Chen et al. 2006). Daher sind pleiotrope Effekte des *denso*-Locus auf die Ausprägung der unterschiedlichen Malzqualitätsmerkmale möglich. Da dieses Phytohormon eine sehr große Zahl von physiologischen Prozessen beeinflusst, sind pleiotrope Effekte auch auf weitere Merkmale, wie das Ährenschieben, wahrscheinlich.

Allerdings kann auch eine Kopplung mehrerer Gene nicht ausgeschlossen werden. In der Region des *denso*-Locus waren ebenfalls zwei Transkriptommarker lokalisiert, welche Komponenten von Signaltransduktionsketten darstellten, und außerdem kartierten die detektierten QTLs nicht exakt in dieselben Markerintervalle (Abbildung 10). Dies sind Indizien, die auf eine Kopplung mehrerer beeinflussender Gene hindeuten.

Ein zweites interessantes Cluster von Malzqualitäts-QTLs konnte im Markerintervall Bmag112-cP75M48_406 (BIN7) auf dem kurzen Arm von Chromosom 3H detektiert

werden. Hier kamen alle positiven Effekte von Alexis. Bis auf einen QTL für Friabilimeter, welchen Herz (2000) detektierte, wurden in der Literatur keine weiteren Malzqualitäts-QTLs in dieser Region beschrieben.

Chromosom 4H

Auf diesem Chromosom konnten in der Region um den *mlo*-Locus (BIN9-10) QTLs für Extraktgehalt, Brabender, Friabilimeter, Rohproteingehalt sowie Gehalt an löslichem Stickstoff kartiert werden. Ein weiterer wichtiger QTL für den Malzqualitätsindex wurde circa 15 cM entfernt in Richtung Centromer im Markerintervall cP71M51_388–EBmac701 detektiert. Donor der positiven Allele war für alle Merkmale Steina. In der Region des *mlo*-Locus gelang es mehreren Autoren in unterschiedlichen Populationen QTLs für die Malzqualität zu kartieren. Von Korff et al. (2008) detektierten in dieser Region einen QTL für Rohproteingehalt. Auch Bezzant et al. (1997) und Mather et al. (1997) entdeckten hier jeweils einen QTL für Extraktgehalt sowie für Rohproteingehalt. Der *mlo*-Locus selber ist für die rassenunspezifische Mehlauresistenz in der Gerste verantwortlich (Büschges et al. 1997). Hierbei wird es sich wahrscheinlich nicht um Pleiotropie dieses Locus auf die Malzqualität, sondern um Kopplung mit für die Malzqualitäts-QTLs verantwortlichen Genen handeln.

Chromosom 5H

Auf Chromosom 5H wurden in der vorliegenden Population die wichtigsten QTLs für die Malzqualität detektiert. Alle positiven Effekte kamen dabei von Alexis. Ein Cluster mit Haupt-QTLs für die proteolytischen Parameter und die VZ45°C sowie weiteren QTLs für Rohproteingehalt, Friabilimeter, Brabender und Malzqualitätsindex, welches mit Transkriptommarkern assoziiert war, konnte auf dem kurzen Arm identifiziert werden. Dieser „Hot Spot“ liegt ca. 10 cM distal von der Centromerregion des Chromosoms entfernt. Die Centromerregion des Chromosoms (BIN5/6) ist ein Bereich, in dem in sehr vielen Populationen aus sehr verschiedenen Genpools QTLs für Malzqualitätsparameter detektiert werden konnten. In amerikanischen Studien, die mit der Population Harrington × Morex durchgeführt wurden, konnten vor allem im Markerintervall MWG635-ABC302a, welches im Bereich des Centromers lokalisiert ist, QTLs für Friabilimeter, Alpha-Amylaseaktivität, Extraktgehalt, Rohproteingehalt

detektiert werden (Marquez-Cedillo et al. 2000, Edney et al. 2004). Ebenfalls an dem RFLP-Markerlocus ABC302 lokalisiert waren in der Steptoe × Morex Population QTLs für Beta-Glucan Gehalt und Beta-Glucanaseaktivität, zwei cytolytische Merkmale (Han et al. 1995). Auch Oziel et al. (1996) fanden in der Dicktoo (Wintergerste) × Morex (Sommergerste) Population in der Region um diesen Locus zahlreiche QTLs für Rohproteingehalt, Eiweißlösungsgrad, Diastatische Kraft, Alpha-Amylaseaktivität, Extraktgehalt, Beta-Glucan Gehalt und Extrakt Differenz, ein Merkmal, das als Indikator für die Amylyse dient. Emebiri et al. (2003) lokalisierten in einer australischen Population aus zwei Zuchtstämmen, genauso wie Moralejo et al. (2004) in einer Beka (europäische Braugerste) × Logan (amerikanische Braugerste) Population, einen Haupt-QTL für Rohproteingehalt in der Region der Bmag337/Bmac96 Loci. Einen Haupt-QTL für Beta-Glucan Gehalt konnte in derselben Population ebenfalls an diesem Locus detektiert werden (Molina-Cano et al. 2007). Weitere QTLs in dieser Region wurden in europäischen Populationen detektiert. Von Korff et al. (2008) fanden in einer AB-QTL-Studie QTLs für Friabilimeter, VZ45°C und die Alpha-Amylaseaktivität in dieser Region. Einen Haupt-QTL für Fermentabilität kartierten Swanston et al. (1999) in einer Derkado (Braugerste) × B83 (Zuchtstamm) Population in diesem chromosomalen Abschnitt von 5H. Weitere QTLs für „Mahlenergie“, einem cytolytischen Parameter vergleichbar mit dem Brabender, fanden Chalmers et al. (1993) ebenfalls auf dem kurzen Arm des Chromosoms in einer Nachkommenschaft der Kreuzung Blenheim × E224/3.

Eine weitere interessante Region auf Chromosom 5H liegt im Intervall GBS304-cP64M55_223 (BIN10/11), in der QTLs für VZ45°C, Eiweißlösungsgrad und Gehalt an löslichem Stickstoff im vorliegenden Material gefunden wurden. Bis auf einen QTL für Alpha-Amylaseaktivität, den Hayes et al. (1993) in der Steptoe × Morex Population in der Region um den Markerlocus ABG473 detektierten, konnten keine weiteren Übereinstimmungen mit in der Literatur berichteten Malzqualitäts-QTLs gefunden werden. Auch für das QTL-Intervall um den Bmag222 Locus (BIN13) auf dem langen Arm von Chromosom 5H konnten in der Literatur keine vergleichbaren QTLs identifiziert werden.

Das für die Malzqualität eine große Rolle spielende Merkmal der Keimruhe (Dormanz), wurde in vielen QTL-Studien ebenfalls ausführlich untersucht. Bei der Mälzung ist eine schnelle und gleichmäßige Keimung der Gerste die Voraussetzung für eine optimale Malzqualität, daher ist ein schneller Abbau der Keimruhe notwendig. Der Übergang der Keimruhe in die Keimung wird durch ein komplexes Zusammenspiel der Phytohormone Gibberellinsäure und Abscisinsäure determiniert (White et al. 2000), wobei die Abscisinsäure für die Aufrechterhaltung der Keimruhe verantwortlich ist. Gibberellinsäure ist der wichtigste auslösende Faktor für die Keimung und sorgt somit für den Abbau der Keimruhe. Für das Merkmal der Keimruhe wurden unter anderem mehrere moderate bis kleine QTLs detektiert, die sich über die Chromosomen verteilen. Zwei Haupt-QTLs, die bis zu 50% der phänotypischen Variation erklärten, konnten jedoch in vielen Populationen konstant in der Centromerregion (*SD1*) und distal am Telomer (*SD2*) des langen Arms von Chromosom 5H beobachtet werden (Ullrich et al. 1993, Romagosa et al. 1999, Li et al. 2003a, Prada et al. 2004), Regionen in denen auch QTLs für Malzqualitätsparameter lokalisiert sind. In aktuellen Studien konnte, wie für den *denso*-Locus, ein GA20-Oxidase codierendes Gen am *SD2*-Locus kartiert werden (Li et al. 2004). Dieses Gen spielt, wie bereits oben beschrieben, eine Rolle in der Gibberellinsäurebiosynthese. Die Gibberellinsäure wiederum ist ein auslösender Faktor der Keimung, daher handelt es sich hier um ein wichtiges Kandidatengen, welches für die Ausprägung der Keimruhe bzw. der Malzqualität große Bedeutung hat. Die Region um den *SD2*-Locus konnte jedoch im vorliegenden Material nicht kartiert werden und liegt daher wahrscheinlich fixiert zwischen den Kreuzungseltern Alexis und Steina vor.

Auf Chromosom 5H scheinen sich entlang des gesamten Chromosoms verteilt Faktoren zu befinden, die sich unmittelbar auf die Qualität auswirken. Es kann angenommen werden, dass Gene in diesen Bereichen, vor allem in der Region um den Centromer, Schlüsselprozesse während der Keimung induzieren, was eine Kaskade an Effekten während der Mälzung zur Folge hat. Diskutiert werden „Multi Locus Cluster“ oder mögliche genetische Faktoren, die eine Kaskade von enzymatischen Prozessen während der Mälzung beeinflussen (Mather et al. 1997, Oziel et al. 1996). Die oben beschriebene Kartierung der GA20-Oxidase in ein QTL-Cluster für Malzqualität und auch die vorliegenden Ergebnisse, in denen QTL-assoziierte Transkripte vor allem für Komponenten der Signaltransduktion codieren, bestätigen diese Hypothese.

Chromosom 6H

QTLs für VZ45°C, Endvergärungsgrad, Viskosität, Malzqualitätsindex und Alpha-Amylaseaktivität konnten im Bereich des *Alpha-Amylase1*-Locus (*amy1*, BIN9) in der Alexis × Steina Population identifiziert werden. Alpha-Amylase ist ein Schlüsselenzym im Mälzungsprozess. Es stellte sich in der vorliegenden Arbeit heraus, dass der aus dem *Alpha-Amylase1*-Gen entwickelte SNP-Marker einen Polymorphismus zwischen Alexis und Steina anzeigte und dieser einen Einfluss auf die Alpha-Amylaseaktivität besaß. Es konnten außerdem drei cDNA-AFLP-Marker in die Region des *Alpha-Amylase1*-Locus integriert werden (Abbildung 10). Auch in den Halbgeschwisterpopulationen Alexis × Golf sowie Alexis × Sloop konnten QTLs für Endvergärungsgrad und Alpha-Amylaseaktivität in einem Intervall um den *Alpha-Amylase1*-Locus detektiert werden (Herz 2000, Panozzo et al. 2007). Marquez-Cedillo et al. (2000) wiesen die Anwesenheit von QTLs mit Einflüssen auf Diastatische Kraft und Alpha-Amylaseaktivität an diesem Locus nach und auch Mather et al. (1997) fanden in dieser genomischen Region QTLs für Alpha-Amylaseaktivität, Diastatische Kraft und Viskosität. Von Korff et al. (2008) identifizierten hier ebenfalls einen QTL für Viskosität.

Chromosom 7H

Auf diesem Chromosom wurden neben mehreren kleinen QTLs für die Viskosität, Extraktgehalt, Brabender, VZ45°C und Friabilimeter auch zwei wichtige QTLs für Gehalt an löslichem Stickstoff und Eiweißlösungsgrad in Markerintervall HVM5–gE35M59_424 (BIN12) entdeckt. In dieser Genomregion konnten Oziel et al. (1996) in der Dicktoo × Morex Population einen QTL für Rohproteingehalt identifizieren. In der Harrington × TR306 Population waren auf dem entsprechenden Chromosomenabschnitt QTLs für Diastatische Kraft und Extrakt Differenz, einem amylolytischen Merkmal, positioniert (Mather et al. 1997).

4.4 QTL-basierte Fragmentanalyse

Mittels cDNA-AFLP identifizierte, durch Kleinmälzung induzierte Gene der Gerste

Basierend auf der Kartierung und der QTL-Analyse wurden die Transkriptommarker, die enge Kopplungen zu den quantitativen Effekten auf die Malzqualität zeigten, isoliert, kloniert und sequenziert. Das Ziel war es, potentielle Kandidatengene für Malzqualität zu identifizieren und aus diesen Fragmenten, wenn möglich, genomische Selektionsmarker für Malzqualität zu entwickeln. Insgesamt konnten 17 cDNA-AFLP-Marker sequenziert werden. Zur Aufklärung der Genfunktion der sequenzierten TDFs wurde eine BLAST-Abfrage durchgeführt.

Im Bereich des wichtigen QTL „Hot Spots“ auf dem kurzen Arm von Chromosom 5H kartierten mehrere Transkriptommarker. Für die Marker cP68M59_571, cP76M52_228, cP72M59_571 und cP78M55_201 konnten keine Ähnlichkeiten mit Gensequenzen bereits bekannter Funktion festgestellt werden. Für diese Fragmente konnten, mit Ausnahme von Marker cP76M52_228, jedoch hohe Homologien zu EST-Sequenzen detektiert und teilweise zur Markerentwicklung genutzt werden.

Ähnlich den Arbeiten von Leymarie et al. (2007) und De Diego et al. (2006) konnten auch in dieser Arbeit für einige der wichtigsten Transkriptommarker keine putative Funktion durch eine BLAST-Abfrage gefunden werden und dies zeigt, dass mehr Gene in das komplexe System der Keimung und Mälzung involviert sind als die bisher detektierten.

Einige cDNA-AFLP-Fragmente, denen mittels BLAST-Abfrage potentielle Funktionen zugeordnet werden konnten, zeigten Homologien zu Genen, die für Komponenten der Signaltransduktion codieren (Tabelle 34). Die Keimung ist das Ergebnis vieler Signaltransduktionsnetzwerke. Einer der wichtigsten auslösenden Faktoren der Samenkeimung ist das Pflanzenhormon Gibberellinsäure. Während der Keimung wird Gibberellinsäure im Embryonalgewebe des Samens produziert und in die Aleuronschicht verlagert. In dieser wird über komplexe Signaltransduktionen, die Produktion verschiedener hydrolytischer Enzyme aktiviert. Diese Enzyme wiederum werden ins Endosperm abgesondert, wodurch Reservestoffe, wie die Stärke, mobilisiert werden. Als Antagonist der Gibberellinsäure ist die Abscisinsäure, ebenfalls als

Ausgangsmolekül hochkomplexer Signalübertragungen, für die Aufrechterhaltung der Keimruhe verantwortlich. Dieser Antagonismus ist ein wichtiger Faktor, der den Übergang der Keimruhe in die Keimung kontrolliert (White et al. 2000).

Eine große Anzahl verschiedener Komponenten sind potentiell in dieses komplexe System aus Signaltransduktionen im Aleuron und damit in die Regulierung der Genexpression der hydrolytischen Enzyme involviert, wie z.B. GTP-bindende Proteine (Ashikari et al. 1999), Kinasen (Gomez-Cadenas et al. 1999) und Proteinphosphatasen (Kuo et al. 1996). Einen ausführlichen Überblick über die molekularen Grundlagen der Signaltransduktion in der Aleuronschicht geben Lovegrove und Hooley (2000).

Der Transkriptommarker cP68M48_488, in dem QTL-Intervall auf dem kurzen Arm von Chromosom 5H gelegen, zeigte hohe Homologien zu einem RAS-ähnlichem Protein RAB (Tabelle 34). Diese Proteine spielen als GTP-bindende Faktoren eine Rolle in der Signaltransduktion an der Plasmamembran im Aleuron von Getreidekörnern (Bethke et al. 1997). Kandidatengene, die für RAS-ähnliche Proteine codieren, wurden in einer Reihe von Genexpressionsstudien zur Samenkeimung bzw. Hormonantwort detektiert. In den verschiedenen Studien konnte eine Hochregulierung der Gene durch Abscisinsäure beobachtet werden. Bei Behandlung mit Gibberellinsäure ging die Expression der Gene dagegen zurück (Ritchie et al. 1998, Bove et al. 2005, Chen et al. 2006, Sreenivasulu et al. 2006). Es ist anzunehmen, dass diese Proteine eine Rolle bei der Signalübertragung spielen, die mit der Erhaltung der Keimruhe in Zusammenhang steht (Nicolas et al. 1998, Aharoni et al. 2002).

Das cDNA-AFLP-Fragment cP64M55_223, war mit QTLs für VZ45°C, Eiweißlösungsgrad und Gehalt an löslichem Stickstoff auf Chromosom 5H assoziiert. Die Sequenz zeigte streckenweise Homologien mit einem SKP1-Protein, einer Komponente des sogenannten SCF-Komplexes. Dieser wiederum ist Bestandteil des Ubiquitin/26S Proteasom Signalweges. Dieser Komplex hat eine Vielzahl von Signalfunktionen in biologischen Prozessen. Unter anderem ist er in proteolytische Prozesse während der Embryoentwicklung involviert. Zudem spielt dieser Komplex ebenfalls eine Rolle in der Gibberellinsäure-Signalgebung, indem es die Inhibitoren des Hormons abbaut (Moon et al. 2004). Gibberellin setzt dann über weitere Signaltransduktionsketten die Sekretion von hydrolytischen Enzymen in Gang. In

einigen Expressionsanalysestudien zur Hormonantwort und Keimung konnten Komponenten dieses Komplexes detektiert werden (Bove et al. 2005, Chen et al. 2006, Sreenivasulu et al. 2006).

Die Transkripte cP75M48_406, cP64M47_325 und cP66M47_328, die mit QTL-Clustern auf Chromosom 3H assoziiert waren, hatten Ähnlichkeiten mit Phosphodiesterase, Serin/Threonin Kinase und Phosphatase codierenden Genen (Tabelle 34). Diese Enzyme spielen in der Signalweiterleitung und der Modellierung der Genexpression bei einer großen Anzahl von zellulären Prozessen eine Rolle. Phosphorylierungskaskaden, in welche die oben genannten Enzyme eingebunden sind, gehören zu den ubiquitären Mechanismen der Signalweiterleitung. Über diese werden bestimmte Enzym- oder Transkriptionsfaktoraktivierungen sowie Proteindegradationen oder Proteintransporte reguliert. Die Aktivierung erfolgt über Proteinkinasen oder Proteinphosphatasen, die durch Übertragung von Pyrophosphat nachfolgende Enzymaktivitäten verändern können. Phosphorylierungskaskaden sind sowohl in Gibberellin- als auch in Abscisinsäure gesteuerten Signaltransduktionswegen involviert (Kuo et al. 1996, Ritchie und Gilroy 1998). Eine Reihe von verschiedenen Proteinkinasen und Phosphatasen codierenden Genen wurden bereits in der Aleuronschicht von Getreidekörnern identifiziert (Gomez-Cadenas et al. 1999, McCubbin et al. 2004, Bove et al. 2005, Chen et al. 2006, Sreenivasulu et al. 2006).

Weitere Transkripte, die in interessanten QTL-Regionen in der Alexis × Steina Population lagen und streckenweise Ähnlichkeiten mit z.B. einem putativen Nukleoid-DNA bindenden Protein (cP67M62_270, 6H), einem putativen NAC-Gen (cP70M48_294, 5H), einem 60S ribosomalen Protein L1 (Marker cP71M51_388, 4H) und einem Hitzeschockprotein codierendem Gen (cP65M51_570, 5H) zeigten, wurden in anderen Studien zur differentiellen Genexpression während der Samenkeimung oder Mälzung entdeckt (Potokina et al. 2002, 2004, Mikolajewski et al. 2005, Robertson 2004, Bove et al. 2005, Lapitan et al. 2006, Toorop et al. 2005, Chen et al. 2006, De Diego et al. 2006, Sreenivasulu et al. 2006).

Die NAC-Proteine gehören zu den pflanzlichen Transkriptionsfaktoren. Unter anderem konnten sie mit der Regulation der Gibberellinsäure im Aleuron in Verbindung gebracht werden. Untersuchungen haben gezeigt, dass NAC-Faktoren die Gibberellinsäure

bedingte Hochregulation der Alpha-Amylase Expression im Aleuron inhibieren (Robertson 2004). Auch Nukleoid-DNA bindende Proteine besitzen, neben der Modulation der Chromosomenstruktur, wichtige Aufgaben bei der Regulation der Transkription. Ein direkter Zusammenhang mit der Keimung bzw. Mälzung konnte bisher aber noch nicht nachgewiesen werden.

Ein Hitzeschockprotein homologes Fragment (HSP70) wurde erstmals von Mikolajweski et al. (2005) in einem Sortenscreening zur Expressionsanalyse während der Vermälzung als differentiell zwischen Alexis und Steina detektiert. Das Fragment konnte nachfolgend auf den langen Arm des Chromsoms 5H kartiert werden und war mit QTLs für Extraktgehalt, Brabender, Friabilimeter und Malzqualitätsindex assoziiert. Hitzeschockproteine haben eine wichtige Funktion als molekulare Chaperone, die neben der Proteinbiogenese bei der Reaktion auf Stress vor allem bei der Samenkeimung (Sung et al. 2001) von Gerste von Bedeutung sind. Potokina et al. (2004) identifizierten ebenfalls in einer Expressionsanalyse während der Vermälzung ein Hitzeschockprotein homologes Fragment. Die Autoren schlussfolgerten, dass diese Hitzeschockproteine die hydrolytischen Enzyme während der Mälzung vor Denaturierung schützen und so zur Verbesserung der Thermostabilität dieser Enzyme beitragen.

Eine Reihe von kartierten Transkripten zeigte keine Assoziation mit der Malzqualität. Dies war zu erwarten, da die Keimung eines der transkriptionsaktivsten Stadien in der Entwicklung der Pflanze darstellt, an welchem eine große Zahl von Genen beteiligt ist. Diese Gene codieren für Proteine sehr verschiedener Stoffwechselwege und müssen damit keinen direkten Einfluss auf die Ausprägung der Malzqualität besitzen. Ein Vorteil des in dieser Arbeit genutzten Ansatzes, der Kombination von Transkriptom- und QTL-Analyse, lag in der Möglichkeit, eine gezielte Auswahl derjenigen Transkripte vornehmen zu können, die einen gesicherten Zusammenhang mit der Malzqualität aufweisen (Abbildung 10).

Zusammenfassende Betrachtungen

Es ist gelungen, auf der Basis der Transkriptomkartierung und der anschließenden QTL-Analyse, cDNA-AFLP-Marker in enger Kopplung zu wichtigen QTL-Clustern zu identifizieren. Ob diese jedoch ursächlich für die Ausprägung der Malzqualität verantwortlich sind, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht vollständig geklärt werden.

Die in dieser Arbeit detektierten polymorphen Transkripte, die mit wichtigen QTLs assoziiert waren, zeigten zum großen Teil Ähnlichkeiten mit Komponenten von Signaltransduktionskaskaden, die in Zusammenhang mit der hormonellen Signalgebung stehen. Im Verlauf der Vermälzung führt eine Kaskade genotypabhängiger Veränderungen der Genexpression zu spezifisch induzierten Enzymaktivitäten, welche letztendlich die Malzqualität der einzelnen Genotypen bestimmen. Daher sind spezifische Änderungen der Genexpression durch den Einfluss der oben aufgeführten Faktoren als Ursache der Variation in der Ausprägung der Malzqualität möglich.

Die beiden Kreuzungseltern Alexis und Steina sind Sorten mit hoher Malzqualität. Untersuchungen, in denen aus einer großen Anzahl von bereits bekannten Strukturgenen für die Malzqualität molekulare Selektionsmarker entwickelt wurden (Matthies et al. 2006), zeigten einen extrem niedrigen Polymorphiegrad in diesen Kandidatengenen zwischen Alexis und Steina (I. Matthies mündl. Mitteilung). Die in der vorliegenden Studie detektierten QTLs kartierten zum größten Teil nicht in Regionen, in denen bereits bekannte Gene, die einen Einfluss auf die Malzqualität haben, lokalisiert sind. So konnten beispielsweise auf Chromosom 7H, auf dem einige wichtige die Malzqualität beeinflussende Gene wie die Alpha-Amylase2, eine Beta-Glucanase oder die Grenz-Dextrinase lokalisiert sind, nur kleinere QTLs identifiziert werden, die nicht mit den bekannten Genloci cosegregierten. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass Unterschiede in der Malzqualität auch auf regulatorische Unterschiede bzw. Unterschieden in der Signaltransduktion zurückgeführt werden können. Eine große Anzahl von QTLs verschiedener phänotypischer Merkmale, die durch einen „positional cloning“ Ansatz kloniert werden konnten, waren auf Kandidatengene, die Komponenten von Signaltransduktionsketten darstellen, zurückzuführen (Flint und Mott 2001, Korstanje und Paigen 2002). Bentsink et al. (2006) klonierten einen QTL für Samenruhe in Arabidopsis, mit bisher unbekannter Funktion. Dem isolierten Gen konnte auch nach intensiver BLAST-Abfrage keine putative Funktion zugeordnet werden. Aus den Analysen ergab sich jedoch eine eindeutige Induktion dieses Gens durch Abscisinsäure. In einer Studie zur Feinkartierung der Centromerregion von Chromosom 7H der Steptoe × Morex Population, in der ein Cluster von Malzqualitäts-QTLs am *Alpha-Amylase2*-Locus detektiert werden konnte, stellte sich heraus, dass nicht der *Alpha-Amylase2*-Locus selber für die QTL-Effekte verantwortlich war, sondern regulatorische Gene in derselben Region (Han et al. 1997b).

4.5 Ableitung von genomischen Selektionsmarkern aus polymorphen Transkripten

Um auf Expressionsebene detektierte Transkripte auf genomischer Ebene als Selektionsmarker nutzen zu können, müssen diese in allelspezifische Marker umgewandelt werden. In der vorliegenden Arbeit konnten zwei Transkriptommarker, die Assoziationen mit QTL-Clustern auf Chromosom 5H zeigten, von der Expressionsebene auf die genomische Ebene rückübertragen werden (Kapitel 3.9). Eine Möglichkeit der Markerentwicklung bestand darin, mittels PCR in die flankierenden Sequenzen der cDNA-AFLP-Fragmente hinein zu amplifizieren, um so die Fragmente zu vergrößern und die Chance auf eine SNP-Detektion durch anschließende vergleichende Sequenzierung der Kreuzungseltern zu erhöhen. Im Gegensatz zu genomischen AFLP-Markern, aus denen STS-Marker abgeleitet werden sollen, und bei denen komplexe und aufwendige Techniken, wie das „Chromosome Walking“ oder „Inverse PCR“ (Brugmans et al. 2003, Michiels et al. 2003) durchgeführt werden müssen, ist es bei cDNA-AFLP-Markern, die auf exprimierten Genen beruhen, möglich, durch eine BLAST-Abfrage in EST-Datenbanken und einem anschließendem Alignment mit homologen ESTs, die Sequenzen über die Restriktionsschnittstellen hinweg in die bisher unbekannt flankierenden Sequenzen der Marker zu gelangen. Auf diese Weise konnte für das Fragment cP64M55_223 ein CAPS-Marker, basierend auf einem SNP in der *Pst*I-Schnittstelle des Fragmentes, abgeleitet werden. Dies zeigt eindeutig, dass der zugrunde liegende Polymorphismus auf einen Sequenzunterschied im codierenden Bereich des Gens zurückzuführen ist und nicht auf eine differentielle Exprimierung des Gens.

Für das Fragment cP68M59_571 konnte trotz ausführlicher Sequenzanalysen kein Polymorphismus im codierenden Bereich, weder in den Restriktionsschnittstellen noch in den Primerbindungsstellen, detektiert werden, obwohl der Marker als klarer 0/1 Polymorphismus ausgewertet werden konnte. Da trotz dieser klaren Hinweise auf allelische Unterschiede ein Expressionsunterschied vorliegen kann (Fernandez-del-Carmen et al. 2007), müssten zur definitiven Aufklärung weiterführende Untersuchungen, z.B. die Analyse weiterer Zeitpunkte während der Vermälzung, durchgeführt werden. Der Marker für dieses Fragment wurde auf Basis eines SNPs im nicht codierenden Bereich entwickelt.

Identifizierte SNPs, die im codierenden bzw. regulatorischen Bereich eines Gens lokalisiert sind, können direkt kausale Mutationen darstellen, die einen Teil der Variation des beobachteten Merkmals erklären. SNPs mit signifikanten Assoziationen im nicht codierenden und nicht regulatorischen Bereich eines Gens können mit der tatsächlich kausalen Mutation im selben oder einem der benachbarten Gene im Kopplungsungleichgewicht (Linkage disequilibrium) liegen und sind vor dem Hintergrund einer Verwendbarkeit der Ergebnisse ähnlich informativ (Seefried 2007).

Die beiden auf Expressionsebene abgeleiteten Marker SNP16_MQ/5H und CAPS12_MQ/5H konnten in einem Sommergerstensortiment validiert werden (Kapitel 3.9). Die mit den vorteilhaften Allelen selektierten Sorten zeigten in zahlreichen Malzqualitätsparametern signifikante Verbesserungen im Vergleich zum Mittelwert aller Sorten. Durch die funktionelle Assoziation der Marker mit dem phänotypischen Merkmal können diese Marker über ein breites Sortenspektrum hinweg verwendet werden, und sind nicht nur spezifisch für einen bestimmten genetischen Hintergrund (Moralejo et al. 2004). Häufig sind wichtige QTLs in Regionen lokalisiert, in denen eine unterdrückte Rekombination beobachtet werden kann. Anonyme genomische Marker, die genetisch eng mit dem QTL gekoppelt scheinen, können physikalisch sehr weit entfernt liegen, so dass Rekombination möglich wäre. Ist dagegen der Polymorphismus in dem Gen lokalisiert, das funktionell mit dem zu untersuchenden Merkmal assoziiert ist, so ist diese Schwierigkeit nicht gegeben und ein sichererer Einsatz in der MAS möglich (Thomas et al. 2003, Varshney et al. 2007a).

Ein alternatives Verfahren um Unterschiede in der Genexpression während der Mälzung mit phänotypischen Unterschieden in der Ausprägung der Malzqualität verschiedener Genotypen zu korrelieren und als genomische Marker zu kartieren, wurde von Potokina et al. (2004) erarbeitet. Sie konnten differentiell exprimierte Kandidatengene identifizieren, die mit verschiedenen Malzqualitätsparametern assoziiert waren und in abgeleiteter Form, als SNP- oder RFLP-Marker, in Malzqualitäts-QTL Regionen in der Steptoe × Morex Population lokalisiert werden konnten.

4.6 Züchterische Anwendbarkeit der QTLs bzw. abgeleiteten Marker

Der Einsatz von molekularen Markern in der Selektion ist vor allem lohnend bei Merkmalen, die eine mittlere bis niedrige Heritabilität zeigen und deren Phänotypisierung schwierig, kostspielig und zeitintensiv ist (Asins et al. 2002). Insgesamt stellt die markergestützte Selektion eine effizientere Entwicklung neuer Sorten in Aussicht, da Genotypen mit gewünschten Eigenschaften früher und gezielter als mit phänotypischer Selektion identifizierbar sind. Wenn auf mehrere Merkmale gleichzeitig selektiert wird, z.B. auf Qualität und verschiedene Resistenzgene, so kann der Selektionsgewinn erheblich erhöht werden (Brennan et al. 2005). Da Einzelparameter der Malzqualität in einzelnen Sorten nahezu optimiert sind, sind Qualitätsverbesserungen nur durch Neukombination von QTLs bzw. Genen möglich, die durch eine markergestützte Selektion schnell und effizient detektiert werden können. Im Gegensatz zu Resistenzeigenschaften, bei denen phänotypische Tests oft hocheffektiv und kostengünstig durchführbar sind, stellt die Phänotypisierung der Malzqualität ein aufwendiges Verfahren dar, so dass die Entwicklung molekularer Marker für die Selektion auf dieses komplexe Merkmal große Vorteile verspricht. Nichtsdestotrotz müssen unter wirtschaftlichen Gesichtspunkten auch die Kosten sowie der Zeitaufwand der Markerentwicklung mit beachtet werden (Brennan et al. 2005).

Den Erfolg einer markergestützten Selektion auf Malzqualität zeigten Igartua et al. (2000) und Ayoub et al. (2003). In beiden Studien wurde eine markergestützte Selektion auf QTLs für Malzqualitätsparameter auf Chromosom 5H durchgeführt. Die in der Harrington × TR306 Population detektierten QTLs in den beiden Telomerregionen von Chromosom 5H konnten von Igartua et al. in nicht für die Kartierung genutzten Linien der Population validiert werden. Ayoub et al. (2003) verifizierten einen, in der Steptoe × Morex Population detektierten, QTL für Alpha-Amylaseaktivität im Centromerbereich von Chromosom 5H in einer Steptoe × Libelle Population. Ebenfalls in dieser Chromosomenregion wurde schon von Han et al. (1997a) ein QTL für Keimruhe in verschiedenen Halbgeschwisterpopulationen der Steptoe × Morex Kreuzung, mittels markergestützter Selektion nachgewiesen. Coventry et al. (2003) und Collins et al. (2003) validierten in unkartierten, australischen Züchtungspopulationen mittels markergestützter Selektion QTLs für verschiedene Malzqualitätsparameter auf den Chromosomen 1H, 2H, 3H, 4H und 5H. Hier zeigten vor allem Linien, die mit dem

Alexis-Allel des Mikrosatelliten EBmac501 selektiert wurden, signifikante Verbesserungen in bestimmten Malzqualitätsparametern. Dieser Locus wurde ursprünglich in der Alexis \times Sloop Population detektiert und zeigte, über Umwelten hinweg, konstante Effekte auf verschiedene Malzqualitätsparameter.

Der Vergleich der vorliegenden QTL-Analyse mit einschlägigen Veröffentlichungen ergab einige Übereinstimmungen bei der Lokalisierung von Malzqualitäts-QTLs über Umwelten und Populationen hinweg. QTL-Regionen auf den Chromosomen 5H, 1H, 6H, 4H sowie Chromosom 3H zeigten in vielen Populationen Assoziationen mit Malzqualitätsparametern. Vor allem die Übereinstimmungen von QTLs mit den Halbgeschwisterpopulationen Alexis \times Golf und Alexis \times Sloop auf den Chromosomen 1H, 3H, und 6H sind eine gute Bestätigung der vorliegenden QTL-Analyse. Die spezifische Lage der QTLs auf den Chromosomen ist abhängig von der jeweiligen genetischen Karte und der Art der QTL-Berechnung in jeder einzelnen Population. Es existieren im Gerstengenom aber Regionen, die eindeutig bestimmend auf die Malzqualität einwirken. Der Nachweis von Einflüssen, die unabhängig von der Kreuzung oder Umwelt in vergleichbaren Regionen auftauchen, stellt eine gute Basis für die Auswahl geeigneter QTL „Hot Spots“ für die markergestützte Selektion dar.

In der vorliegenden Studie konnten starke QTL-Cluster beobachtet werden (Abbildung 10). Ob diese durch Kopplung oder Pleiotropie zustande kommen, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht restlos geklärt werden. Die verwendete Linienzahl ist zu gering, um eine ausreichende Anzahl von Rekombinationen zu detektieren und dieser Fragestellung genauer nachzugehen. Die Kartierung von acht spaltenden Transkripten auf Chromosom 5H in einer Region von ca. 10 cM kann jedoch als Hinweis dienen, dass es sich hier um Multi-Gen-Cluster handeln könnte. Han et al. (1999) führten in der Centromerregion des Chromosoms 5H eine Feinkartierung für einen mit Keimruhe assoziierten QTL durch und kamen zu dem Schluss, dass ein Gen-Cluster von mindestens drei Genen in der Region lokalisiert sein muss, welches Einfluss auf das Merkmal nimmt.

Das Auftreten von QTL „Hot Spots“ ist ein häufig beobachtetes Phänomen bei der Untersuchung der Malzqualität. Wenn die Vererbung der positiven Allele jedoch gleichgerichtet ist, d.h. alle positiven Einflüsse vom selben Elter stammen, ist die Frage

ob Kopplung oder Pleiotropie vorliegt für die MAS unerheblich. Die QTLs werden so als „Komplex“ vererbt (Zale et al. 2000, Hayes et al. 2003).

Im vorliegenden Fall sind vor allem die QTL Hot Spots auf Chromosom 5H, 6H, 1H und 4H für eine mögliche Nutzung in der MAS von Interesse. Die Intervalle konnten mittlerweile auch, mittels markergestützter Rückkreuzung entwickelter Nah-Isogener Linien (NIL), validiert werden (Herz et al. 2008). Dies bietet eine günstige Ausgangsposition für die züchterische Anwendung. Die in der Arbeit vorliegenden Ergebnisse haben gezeigt, dass die in der Alexis × Steina Population kartierten QTLs qualitätssteigernd verwendet werden können. So führten beispielsweise die beiden Haupt-QTLs für die VZ45°C auf Chromosom 5H und 6H in Kombination zu einer Erhöhung der VZ 45°C um 8% innerhalb der Population (Abbildung 9). Dass die beiden QTL-Intervalle auf Chromosom 5H für die MAS geeignet erscheinen, zeigen auch die Ergebnisse der Selektion von Sommergerstensorten mit den auf Expressionsebene abgeleiteten Markern cP68M59_571 und cP64M55_223 (Kapitel 3.9). Weitere Transkriptommarker, die in allelspezifische Selektionsmarker für Malzqualitätsparameter umgewandelt werden können, sind in dieser Region lokalisiert. Auf Chromosom 6H sind im QTL Intervall ebenfalls flankierende Transkriptommarker sowie SNP- und SSR-Marker lokalisiert, die genutzt werden könnten. Vor allem der *Alpha-Amylase1* SNP-Marker ist von Interesse. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass dieses Kandidatengen einen großen Einfluss auf die Alpha-Amylaseaktivität und damit auch auf die indirekten Parameter Endvergärungsgrad und VZ45°C besitzt (Kapitel 3.5.1.4.3).

Da einzelne QTLs immer nur einen begrenzten Anteil der Varianz erklären, ist eine phänotypische Selektion auf Malzqualität unumgänglich. Han et al. (1997) zeigten für Parameter der Malzqualität, dass eine markergestützte Selektion gefolgt von einer phänotypischen Selektion am effektivsten ist. Sie schlugen eine Strategie vor, in der in den ersten Generationen markergestützt selektiert wird, gefolgt von einer phänotypischen Auslese in den späteren Generationen. Durch die frühe Ausselektion nicht geeigneter Linien kann die Zahl der Nachkommen, die durch eine sehr teure und aufwendige Kleinmälzung evaluiert werden müsste, reduziert werden und damit die Kosten gesenkt sowie die Selektionseffizienz gesteigert werden.

4.7 Ausblick

Die vorliegenden Ergebnisse haben gezeigt, dass es durch die gezielte Induktion der Genexpression mittels Kleinmälzung und die anschließende Transkriptomkartierung möglich war, polymorphe Transkripte mit wichtigen QTLs für die Malzqualität zu assoziieren. Die hier gezeigten Ergebnisse beruhen auf einer breit angelegten Analyse zur Identifikation von Genombereichen bzw. Genen mit Einfluss auf die Qualität. Um weitere Einblicke in die Genaktivität während der Vermälzung zu gewinnen und die bisherigen Ergebnisse vertiefend zu betrachten, können verschiedene methodische Ansätze genutzt werden.

Eine zusätzliche Möglichkeit die in dieser Arbeit generierten Transkriptionsprofile zu analysieren, wäre eine computergestützte quantitative Analyse der cDNA-AFLP-Banden, bei denen die Intensität der Banden und damit die Menge an mRNA gemessen wird. Diese kann anschließend im Sinne des „genetical genomics“-Ansatzes (Jansen und Nap 2001) als eQTL verrechnet werden. Analog zu vielen phänotypischen Merkmalen können auch auf der Ebene des Transkriptoms quantitative Unterschiede beobachtet werden. Mittels eQTL-Analyse können Genomregionen identifiziert werden, in denen Gene lokalisiert sind, die signifikante Effekte auf die Transkriptionsrate/Expressionsmuster der Kandidatengene ausüben. Die Transkripte werden wie in der vorliegenden Arbeit kartiert, und gleichzeitig wird ihre Menge an mRNA (Genprodukt) als QTL verrechnet. Ziel der Untersuchung ist die Feststellung, inwiefern *cis*- oder *trans*- Genregulation für die Merkmalsausprägung relevant ist, d.h. inwieweit die für die Expression verantwortliche Genvariante im Gen selber, bzw. in derselben Genomregion (*cis*) oder in einem vorgeschalteten Gen (*trans*), in einer anderen genomischen Region befindlich, lokalisiert ist. eQTL-Analysen wurden sowohl bereits mit cDNA-AFLP Transkriptionsprofilen als auch mittels Microarrayanalysen durchgeführt (Vuylsteke et al. 2006, West et al. 2007, Potokina et al. 2008). Studien zur eQTL-Analyse werden auch für die Samenkeimung und Entwicklung etabliert (Weschke et al. 2007). In einem „genetical genomics“-Ansatz wurde von Potokina et al. (2006) ein in einer Microarrayanalyse zur differentiellen Genexpression während der Mälzung identifiziertes, Kandidatengen für Serin-Carboxypeptidase als SNP-Marker auf Chromosom 3H lokalisiert. Gleichzeitig wurde das Expressionsniveau dieses Gens in der Population, im Sinne des „genetical genomics“-Ansatzes, als QTL kartiert. Hier

zeigte sich, dass der Expressions-QTL mit dem Strukturgen assoziiert war, in dieselbe Genomregion kartierte und damit *cis* reguliert war.

Um die gefundenen Assoziationen der beiden abgeleiteten Expressionsmarker mit der Malzqualität zu vertiefen und um ein detaillierteres Bild über die Korrelationen der Marker mit einzelnen Parametern der Malzqualität in einem größeren Sortenspektrum zu bekommen sowie eventuell weitere Allele zu detektieren, könnte mit diesen Markern, wie auch mit weiteren QTL flankierenden SNP- oder SSR-Markern, bzw. wenn möglich mit weiteren abgeleiteten interessanten Expressionsmarkern, eine Assoziationskartierung durchgeführt werden.

Bei dieser Methode sucht man nach einer statistisch signifikanten Assoziation zwischen genetischen Markern bzw. den Kandidatengen und dem interessierenden Phänotyp in genetisch diversen Genotypen. Diese Kartierung nutzt das Kopplungsungleichgewicht (LD; Linkage disequilibrium) zwischen einem Gen/Marker und einem bestimmten Phänotyp für eine hochauflösende Kartierung. Die LD-basierte Assoziationskartierung ermöglicht eine vielfach höhere Auflösung der interessierenden Genombereiche als bei der bisherigen QTL-Kartierung möglich war, da statt der Verwendung einzelner Kartierungspopulationen das Kopplungsungleichgewicht in vielen genetisch diversen Genotypen untersucht wird. Von großem Vorteil bei dieser Methode ist, dass keine aufwendigen Experimentalpopulationen erstellt und phänotypisiert werden müssen, sondern dass auf evtl. bereits vorhandene phänotypische Daten von Sorten oder Zuchtstämmen zurückgegriffen werden kann. Außerdem wird ein wesentlich breiterer genetischer Hintergrund untersucht, indem auch Elitezuchtmaterial repräsentiert wird. Eine komplexe und aufwendige Validierung von in biparentalen Populationen detektierten QTLs in anderen genetischen Hintergründen würde damit entfallen. Erste Assoziationskartierungen in Gerste wurden bereits durchgeführt (Kraakman et al. 2004, Malysheva et al. 2006, Rostoks et al. 2006). Kraakman et al. konnten in einer Studie zur Assoziationskartierung von Ertragsmerkmalen in Sommergerstensorten zeigen, dass alle in dieser Verrechnung mit Ertragsmerkmalen assoziierten Marker mit bereits in früheren Studien detektierten Ertrags-QTLs koinzidierten.

Eine andere Möglichkeit um das Potential der in dieser Studie detektierten Malzqualitäts-QTLs in einem anderen genetischen Hintergrund zu validieren, wäre zum

Beispiel eine Einkreuzung dieser QTLs in „Nicht-Braugersten“ Material. Denkbar wäre beispielsweise eine Einkreuzung in Wintergersten. Dabei könnte gleichzeitig eine Pyramidisierung von vorteilhaften Genen, z.B. die Kombination mit Resistenzgenen, durchgeführt werden. Winterbraugerste ist aufgrund der in den letzten Jahren auftretenden Knappheit an Sommergerste für die Malzbereitung eine interessante Alternative für die Brau- sowie auch für die Landwirtschaft geworden.

Weitere Einblicke in die molekularen Grundlagen der Malzqualität können mit Hilfe der Proteomik gewonnen werden. Finnie et al. (2002, 2004) führten eine vergleichende Proteom-Analyse zur Samenentwicklung in verschiedenen Gerstensorten durch und extrahierten Proteine, die in den Proben zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung induziert wurden. Eine Möglichkeit diese Methoden auf das vorliegende Pflanzenmaterial anzuwenden, wäre eine Proteomanalyse der Eltern und der Population zu verschiedenen Zeitpunkten der Vermälzung. Basierend auf den isolierten Sequenzen differentieller Spots könnten molekulare Marker abgeleitet werden, die in die Kopplungskarte rückkartiert und mit der Malzqualität korreliert werden könnten. Bei dieser Methode ist es möglich, sowohl allelische als auch Expressionsunterschiede zu detektieren. Alternativ können die Proteinmuster in einer spaltenden Population quantitativ ausgewertet und als sogenannte pQTLs verrechnet werden (Weschke et al. 2007).

Ein langfristiges Ziel im Sinne eines „Smart Breeding“-Ansatzes wäre die Entwicklung von DNA-Chips (Wang et al. 1998), auf denen sich eine große Zahl von Selektionsmarkern für Malzqualität, die aus Kandidatengenen generiert wurden, befinden. Bei dieser auf allelspezifische Hybridisierung beruhenden Methode könnte gleichzeitig eine große Zahl von relevanten Genen, die eine Rolle in der Ausprägung der Malzqualität spielen, im Zuchtmaterial gescreent werden und eine Frühselektion ermöglichen.

Um generell Gerste mit verbesserten Qualitätseigenschaften zu entwickeln, ist es, neben Marker basierten Verfahren, auch denkbar, mittels Gentransformation Genotypen zu erstellen, die in Hinblick auf einzelne Malzqualitätsparameter verbesserte Enzymeigenschaften aufweisen. In einer Reihe von Studien wurden transgene

Gerstenlinien entwickelt, die veränderte Expressionsmuster in Bezug auf verschiedene Enzyme zeigten. Nuutila et al. (1999) und Horvath et al. (2000) erstellten transgene Gerstenlinien, die eine thermostabilere Beta-Glucanase überexprimierten. Kihara et al. (2000) und Matthews et al. (2001) verbesserten in einem transgenen Ansatz die Aktivität bestimmter Alpha-Amylasen bzw. thermostabiler Beta-Amylasen. Mittlerweile wird versucht auch regulatorische Elemente, welche die Expression der hydrolytischen Enzyme beeinflussen, transgen in Gerste einzubringen und zu überexprimieren. Murray et al. (2006) zeigten, dass Genotypen, die den Transkriptionsfaktor HVGAMYB, eine Komponente der Gibberellinsäure-induzierten Signaltransduktionskette, überexprimierten, auch eine höhere Aktivität verschiedener hydrolytischer Enzyme besaßen. Da bei diesem Ansatz nur einzelne Gene betrachtet bzw. in ihrer Expression verändert werden, ist diese Methode jedoch nicht geeignet die Malzqualität im Allgemeinen zu verbessern, sondern ganz gezielt Merkmale für bestimmte bzw. genau definierte Verwendungszwecke zu modifizieren.

5 Zusammenfassung

Malzqualität ist neben dem Ertrag das wichtigste Zuchtziel in der Gerste. Das Merkmal resultiert aus einem balancierten Zusammenwirken vieler Qualitätskomponenten, die alle quantitativ vererbt werden. Eine Schwierigkeit in Züchtungsprogrammen ist die erst in sehr späten Generationen mögliche genaue phänotypische Selektion auf dieses Merkmal in der Kleinvermälzung. Die Anwendung molekularer Marker stellt hingegen eine Frühselektion des Zuchtmaterials in Aussicht. Auf Genexpressionsebene abgeleitete Marker sind von besonderem Interesse, da sie innerhalb codierender Genombereiche lokalisiert sind und über physiologische Marker-Merkmal-Beziehungen weitere wertvolle Informationen erbringen können.

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit der Erstellung einer Transkriptomkarte für Gerste. In dieser wurden cDNA-AFLP-Marker, welche auf der Genexpression während der Vermälzung beruhen, zusammen mit genomischen Markerdaten in der Alexis × Steina Population (132 DH-Linien) kartiert. Für die cDNA-AFLP-Analysen wurden Kornproben aller DH-Linien 24 h nach Beginn der Vermälzung genommen, die RNA isoliert, cDNA synthetisiert und anschließend eine AFLP-Analyse mit dieser durchgeführt.

Neunundsiebzig spaltende cDNA-AFLP-Marker konnten in die aus 62 SSRs, 101 genomischen AFLPs, acht SNPs und einem morphologischen Marker (*denso*-Verzweigungsgen) bestehenden Gerüstkarte der Population integriert werden, die insgesamt 1138 cM umfasste. Die Transkriptommarker verteilten sich über alle Chromosomen.

Der genaue Einfluss dieser Transkriptommarker auf wichtige Parameter der Malzqualität wurde in einer anschließenden QTL-Analyse mittels Multiple Interval Mapping Ansatzes (MIM) untersucht. Dafür standen Malzqualitätsdaten aus sieben bis acht Umwelten zur Verfügung. In der vorliegenden Studie traten QTLs für verschiedene Malzqualitätsparameter stark gehäuft in Clustern, vor allem auf den Chromosomen 1H, 3H, 4H, 5H und 6H auf. QTL-Intervalle auf den Chromosomen 3H, 5H und 6H wurden direkt von cDNA-AFLP-Markern flankiert. Auf Chromosom 1H und 4H konnten keine cDNA-AFLP-Marker in die QTL-Regionen integriert werden. Vor allem auf Chromosom 5H waren Haupt-QTLs für VZ45°C und die proteolytischen Merkmale

Gehalt an löslichem Stickstoff und Eiweißlösungsgrad mit mehreren cDNA-AFLP-Markern gekoppelt.

Um mögliche Korrelationen und Zusammenhänge von Parametern der Malzqualität mit agronomischen Merkmalen aufzudecken, wurde zusätzlich eine QTL-Analyse für die Merkmale Zeitpunkt des Ährenschiebens, Wuchshöhe sowie Lagerneigung durchgeführt. Für die agronomischen Merkmale lagen Daten aus zwei bis vier Umwelten vor. In der Analyse zeigte sich der große Einfluss des in der Alexis × Steina Population spaltenden qualitativen *denso*-Verzweigungsgens (Chromosom 3H) auf diese Merkmale. Die Haupt-QTLs für die agronomischen Merkmale waren alle mit diesem Locus gekoppelt, der auch großen Einfluss auf einige Malzqualitätsparameter zeigte.

Mit dem Ziel putative Funktionen der mit QTLs für Malzqualitätsparameter gekoppelten Transkriptommarker aufzuklären, und, wenn möglich, Selektionsmarker auf genomischer Ebene aus den Expressionsmarkern abzuleiten, wurden siebzehn cDNA-AFLP-Marker isoliert, kloniert und sequenziert. Nach einer BLAST-Abfrage zeigte sich, dass einigen der interessantesten Transkriptommarker noch keine Funktion zugeordnet werden konnte. Ein weiterer Teil der sequenzierten Fragmente zeigten Homologien mit Genen, die für Komponenten der Signaltransduktion codieren.

Zwei Transkriptommarker, die mit QTL-Clustern für Malzqualität auf Chromosom 5H assoziiert waren, konnten jeweils in einen SNP- bzw. CAPS-Marker umgewandelt werden, mit denen auf genomischer Ebene selektiert werden kann. Die Einsetzbarkeit als Selektionsmarker für Parameter der Malzqualität wurde in einem Sortiment von 40 Sommergersten geprüft. Wurden diese auf die positiven Allele der Marker selektiert, zeigten sich Assoziationen zu vielen Malzqualitätsmerkmalen. Vor allem für die VZ45°C, die proteolytischen und cytolytischen Merkmale sowie für den MQI wurden relative Verbesserungen bis zu 6% im Vergleich zum Mittelwert aller Sorten erreicht.

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse beruhen auf einer breit angelegten Analyse von Genombereichen bzw. Genen, die Einfluß auf die Malzqualität zeigten. Die Verwendung der Ergebnisse als Basis für weitergehende Untersuchungen um Genfunktionen und Regulationsmechanismen im Einzelnen aufzuklären, wurde diskutiert.

6 Summary

Malting quality is one of the most important aims in barley breeding. Malting quality is a complex phenotype, combining a large number of interrelated trait components, each of which shows quantitative inheritance. Phenotyping by micromalting is time consuming, labour intensive and expensive. The methods require large amounts of grain samples than are available in early generations of a breeding program. Therefore marker assisted selection (MAS) could be an important tool to facilitate the selection of desired barley lines within early generations. Functional markers, directly based on candidate genes, are of particular interest, since they are functionally associated with the trait of interest and show a higher transferability. An approach to identify candidate genes and to use them as functional markers is the transcriptome mapping, where polymorphic transcripts, derived from differential gene expression analysis of a segregating population, are used for genetic linkage mapping.

In the present study a cDNA-AFLP based transcriptome map related to malting quality was constructed for a spring barley population (Alexis × Steina, 132 DH lines). For the cDNA-AFLP analysis, grain samples of all DH lines were taken 24 h after starting the malting process, RNA was isolated, followed by cDNA synthesis and AFLP analysis. Seventy-nine segregating transcripts, expressed after specific induction by micromalting were mapped together with 101 genomic AFLPs, 62 SSRs, eight SNPs and one morphological marker (*denso* dwarfing gene). The resulting map covered 1138 cM of the barley genome. Transcriptome markers could be detected on all chromosomes.

The map was used for a QTL analysis with important malting quality parameters, to estimate the exact contribution of these polymorphic transcripts to malting quality. Phenotypic data of seven to eight environments were available. With a multiple interval mapping approach (MIM) method, several malting quality QTLs could be detected, with clusters of QTL on chromosomes 1H, 3H, 4H, 5H and 6H. The QTL “hot spots” on chromosomes 3H, 5H and 6H were associated with transcriptome markers.

In order to estimate the correlations of agronomic traits to malting quality, QTLs for the agronomic traits plant height, heading date and lodging were included into the map. The population was examined for these traits in field trials at three to four locations. The QTL analysis showed the strong influence of the *denso* dwarfing gene (Chromosome

3H) on these traits. Main QTLs for all agronomic traits were detected at this locus. The *denso* locus was also coincident with many malting quality QTLs.

Seventeen cDNA-AFLP markers, linked to important QTLs for malting quality, were cloned, sequenced and a BLAST search was performed. For some of the most important transcriptome markers no putative function could be detected. This indicated, that more genes are involved in the process of germination and malting, as the already known candidate genes. Another part of the sequenced transcripts showed homologies with genes, coding for components of signal transduction pathways.

Two transcriptome markers, co-locating with QTL clusters for malting quality on chromosome 5H were converted into sequence-specific PCR-based markers. Their suitability for the selection of barley varieties concerning their malting quality was tested with a variety panel of 40 spring barley varieties. The favourite alleles of these markers increased the means of malting quality parameters significantly up to 6%, compared to the means of all varieties.

7 Literatur

Aharoni A., O'Connell A. P., 2002. Gene expression analysis of strawberry achene and receptacle maturation using DNA microarrays. *Journal of Experimental Botany* 53: 2073-2087.

Ahmadian A., Gharizadeh B., Gustafsson A. C., Sterky F., Nyren P., Uhlen M., Lundeberg J., 2000. Single-nucleotide polymorphism analysis by pyrosequencing. *Annals of Biochemistry* 280: 103-110.

Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W., Lipman D. J., (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410.

Anderson J.A., Ogihara Y., Sorrells M.E., Tanksley S. D., 1992. Development of a chromosomal arm map for wheat based on RFPL markers. *Theoretical and Applied Genetics* 83: 1035-1043.

Ashikari M., Wu J., Yano M., Sasaki T., Yoshimura A., 1999. Rice gibberellin-insensitive dwarf mutant gene *Dwarf 1* encodes the α -subunit of GTP-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 96: 10284-10289.

Ashikari M., Sasaki A., Ueguchi-Tanaka M., Itoh H., Nishimura A., Datta S., Ishiyama K., Sato T., Kobayashi M., Khush G. S., Kitano H., Matsuoka M., 2002. Loss-of-function of a rice gibberellin biosynthetic gene, *GA20 oxidase (GA20ox-2)*, led to the rice "Green Revolution". *Breeding Science* 52: 143-150.

Asins M. J., 2002. Present and future of quantitative trait locus analysis in plant breeding. *Plant Breeding* 121: 281-291.

Ayoub M., Armstrong E., Bridger G., Fortin M. G., Mather D. E., 2003. Marker-based selection in barley for a QTL region affecting α -amylase activity of malt. *Crop Science* 43: 556-561.

Bachem C. W. B., Van der Hoeven R. S., De Bruijn S. M., Vreugdenhil D., Zabeau M., Visser R. G. F., 1996. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: Analysis of gene expression during potato tuber development. *The Plant Journal* 9: 745-753.

Backes G., 1995. Lokalisierung wirtschaftlich wichtiger, quantitative vererbte Merkmale mit Hilfe von RFLP-Markern bei Gerste. Dissertation TU-München.

Backes G., Orabi J., Fischbeck G., Jahoor A., 2006. Barley. In: Kole Ch. (ed). *Genome mapping and molecular breeding in plants. Volume 1. Cereals and Millets.* Chapter 4: 155-210. Springer Verlag.

Bamforth C. W., Barclay A. H. P., 1993. Malting technology and the uses of malt. In: MacGregor A. W., Bhatti R. S. (eds.). *Barley chemistry and technology.* American Association of Cereal Chemists. Page: 2997-354. St. Paul, Minnesota.

Barr A. R., Jeffries S. P., Broughton S., Chalmers K. J., Kretschmer J. M., Boyd W. J. R., Collins H. M., Roumeliotis S., Logue S. J., Coventry S. J., Moody D. B., Read B. J., Poulsen D., Lance R. C. M., Platz G. J., Park R. F., Panozza J. F., Karakousis A., Lim P., Verbyla A. P., Eckermann P. J., 2003. Mapping and QTL analysis of the barley population 'Alexis' \times 'Sloop'. *Australian Journal of Agricultural Research* 54: 1117-1123.

- Barua U. M., Chalmers K. J., Thomas W. T. B., Hackett C. A., Lea V., Jack P., Forster B. P., Waugh R., Powell W., 1993. Molecular mapping of genes determining height, time to heading and growth habit in barley (*Hordeum vulgare*). *Genome* 36: 1080-1087.
- Bathgate G., Clapperton J., Palmer G., 1973. The significance of small starch granules. *EBC Congress 1973*: 183-196.
- Baumer M., Lenz W., 1991. Entwicklung der Malzqualität in Abhängigkeit von Züchtung und Produktionstechnik. *Der Doemensianer*: 160-169.
- Baumer M., Kipp A., Schweizer G., 1997. Selektion auf die Malzqualität der Gerste mittels molekularer Marker. In: F. Begemann (ed). *Züchterische Nutzung pflanzengenetischer Ressourcen. Tagungsband des Symposiums in Gatersleben am 29.9-01.10. 1997. Schriftenreihe des Informationszentrums für Genetische Ressourcen (IGR). S. 59-70.*
- Baumer M., 2006. Getreide- und Maisanbau. Gerste. In: *Die Landwirtschaft. Pflanzliche Erzeugung. 12. Auflage. Kapitel 11., 468-492.* Editor: Landwirtschaftsverlag Münster-Hiltrup. BLV Buchverlag.
- Becker J., Heun M., 1995a. Barley microsatellites: allelic variation and mapping. *Plant Molecular Biology* 27: 835-845.
- Becker J., Vos P., Kuiper M., Salamini F., Heun M., 1995b. Combined mapping of AFLP and RFLP markers in barley. *Molecular and General Genetics* 249: 65-73.
- Bennett M. D., Leitch I. J., 1995. Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Annals of Botany* 76: 113-176.
- Bentsink L., Jowett J., Hanhart C. J., Koorneef M., 2006. Cloning of DOG1, a quantitative trait locus controlling seed dormancy in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Science* 103: 17042-17047.
- Bethke P. C., Schuurink R., Jones R. L., 1997. Hormonal signalling in cereal aleurone. *Journal of Experimental Botany* 48: 1337-1356.
- Bezant J., Laurie D., Pratchett N., Chojecki J., Kearsey M., 1996. Marker regression mapping of QTL controlling flowering time and plant height in a spring barley (*Hordeum vulgare* L.) cross. *Heredity* 77: 64-73.
- Bezant J. H., Laurie D. A., Pratchett N., Chojecki J., Kearsey M. J., 1997. Mapping of QTL controlling NIR predicted hot water extract and grain nitrogen content in a spring barley cross using marker-regression. *Plant Breeding* 116: 141-145.
- Bishop L. R., 1930. The nitrogen content and quality of barley. *Journal of the Institute of Brewing* 36: 352-369.
- Botstein D., White R. L., Skolnick M., Davis R. W., 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* 32: 314-331.
- Bourne D. T., Powlesland T., Wheeler R. E., 1982. The relationship between total beta-glucan of malt and malt quality. *Journal of the Institute of Brewing* 88: 371-375.

- Bove J., Lucas P., Godin B., Oge L., Jullien M., Grappin P., 2005. Gene expression analysis by cDNA-AFLP highlights a set of new signalling networks and translational control during seed dormancy breaking in *Nicotinia plumbaginifolia*. *Plant Molecular Biology* 57: 593-612.
- Brennan J. P., Rehman A., Raman H., Milgate A. W., Fleming D., Martin P. J., 2005. An economic assessment of the value of molecular markers in plant breeding programs. 49th Annual Conference of the Australian Agricultural and Resource Economics Society. February 2005 Coffs Harbour.
- Breyne P., Dreesen R., Cannoot B., Rombaut D., Vandepoele K., Rombauts S., Vanderhaegen R., Inze D., Zabeau M., 2003. Quantitative cDNA-AFLP analysis for genome-wide expression studies. *Molecular Genetics and Genomics* 269: 173-179.
- Brugmans, B., Del Carmen A. F., Bachem C. W. B., Van Os H., Van Eck H. J., Visser R. G. F., 2002. A novel method for the construction of genome wide transcriptome maps. *The Plant Journal* 31: 211-222.
- Brugmans B., Van der Holst R. G. M., Visser R. G. F., Lindhout P., Van Eck H. J., 2003. A new and versatile method for the successful conversion of AFLP markers into simple single locus markers. *Nucleic Acid Research* 31. e55.
- Buntjer J. B., 2000. CROSS CHECKER: Computer-assisted scoring of genetic AFLP data. In *Plant and Animal Genome VIII. Conference, San Diego, January 9.-12. 2000.* <http://www.intl.pag.org/pag/8/abstracts/pag8664.html>.
- Burger W. C., La Berge D. E., 1985. Malting and brewing quality in barley. In: Rasmusson D. C. (ed). *Barley. Agron Mono 26. ASA, CSSA, and SSS.* Page: 367-401. Madison, Wisconsin.
- Büschges R., Hollrichter K., Panstruga R., Simons G., Wolter M., Fritjes A., Van Daelen R., Van der Lee T., Diergaarde P., Groenendijk J., Topsch S., Vos P., Salamini F., Schulze-Lefert P., 1997. The Barley *Mlo* Gene: A novel control element of plant pathogen resistance. *Cell* 88: 695-705.
- Chalmers K. J., Barua U. M., Hackett C. A., Thomas W. T. B., Waugh R., Powell W., 1993. Identification of RAPD markers linked to genetic factors controlling the milling energy requirements of barley. *Theoretical and Applied Genetics* 87: 314-320.
- Chen X., Sullivan P. F., 2003. Single nucleotide polymorphism genotyping: biochemistry, protocol, cost and throughput. *The Pharmacogenomics Journal* 3: 77-96.
- Chen K., An Y. Q. C., 2006. Transcriptional response to gibberellin and abscisic acid in barley aleurone. *Journal of Integrative Plant Biology* 48: 591-612.
- Churchill G. A., Doerge R. W., 1994. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics* 138: 963-971.
- Collard B. C. Y., Jahufer M. Z. Z., Brouwer J. B., Pang E. C. K., 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica* 142: 169-196.
- Collins H. M., Panozzo J. F., Logue S. J., Jefferies S. P., Barr A. R., 2003. Mapping and validation of chromosome regions associated with high malt extract in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Australian Journal of Agricultural Research* 54: 1223-1240.

- Coventry S. J., Collins H. M., Barr A. R., Jefferies S. P., Chalmers K. J., Logue S. J., Langridge P., 2003. Use of putative QTLs and structural genes in marker assisted selection for diastatic power in malting barley (*Hordeum vulgare* L.). *Australian Journal of Agricultural Research* 54: 1241-1250.
- Cuesta-Marcos A., Igratua E., Ciudad F. J., Codesal P., Russell J. R., Molina-Cano J. L., Moralejo M., Szücs P., Pilar Garcia M., Lasa J. M., Casas A. M., 2008. Heading date QTL in a spring × winter barley cross evaluated in mediterranean environments. *Molecular Breeding* 21: 455-471.
- De Diego J. G., Rodriguez F. D., Rodriguez Lorenzo J. L., Grappin P., Cervantes E., 2006. cDNA-AFLP analysis of seed germination in *Arabidopsis thaliana* identifies transposons and new genomic sequences. *Journal of Plant Physiology* 163: 452-462.
- Desprez T., Amselem J., Caboche M., Hofte H., 1998. Differential gene expression in *Arabidopsis* monitored using cDNA arrays. *The Plant Journal* 14: 643-652.
- Duffus C. M., Rosie R., 1976. Changes in major element composition of developing barley-grain. *Journal of Agricultural Science* 86: 627- 632.
- Edney M., 1988. The importance of β -glucan size and concentration on malting and brewing. Dissertation TU-München.
- Edney M. J., Mather D. E., 2004. Quantitative trait loci affecting germination traits and malt friability in a two-rowed by six-rowed barley cross. *Journal of Cereal Science* 39: 283-290.
- Eglinton J. K., Langridge P., Evans D. E., 1998. Thermostability variation in alleles of barley beta-amylase. *Journal of Cereal Science* 28: 301-309.
- Emebiri L. C., Moody D. B., Panozzo J. F., Chalmers K. J., Kretschmer J. M., Ablett G. A., 2003. Identification of QTLs associated with variations in grain protein concentration in two-rowed barley. *Australian Journal of Agricultural Research* 54: 1211-1221.
- Falconer D. S., 1984. Einführung in die quantitative Genetik. Verlag Eugen Ulmer. Stuttgart.
- Fehr W. R., 1987. Principles of cultivar development. Theory and technique. Volume 1, Macmillan, New York.
- Fernandez-del-Carmen A., Celis-Gamboa C., Visser R. G. F., Bachem C. W. B., 2007. Targeted transcript mapping for agronomic traits in potato. *Journal of Experimental Botany* 58: 2761-2774.
- Fincher G. B., 1975. Morphology and chemical composition of barley endosperm cell walls. *Journal of the Institute of Brewing* 81: 116-122.
- Fincher G. B., Stone B., A., 1986. Cell walls and their components in cereal grain technology. In: Pommaranz Y.(ed). *Advances in cereal science and technology*. Volume 8. American Association of Cereal Chemists. Page: 207-295. St. Paul, Minnesota.
- Finnie C., Melchior S., Roepstorff P., Svensson B., 2002. Proteome analysis of grain filling and seed maturation in barley. *Plant Physiology* 129: 1308-1319.

- Finnie C., Maeda K., Ostergaard O., Bak-Jensen K. S., Larsen J., Svensson B., 2004. Aspects of the barley seed proteome during development and germination. *Biochemical Society Transactions* 32: 517-519.
- Fischbeck, G., 1992. Barley cultivar development in Europe. Success in the past and possible changes in the future. *Barley Genetics VI Munksgaard, Copenhagen*. Seite: 887-901.
- Flint J., Mott R., 2001. Finding the molecular basis of quantitative traits: successes and pitfalls. *Nature Reviews (Genetics)* 2: 437-445.
- Fox G. P., Panozzo J. F., Li C. D., Lance R. C. M., Inkerman P. A., Henry R. J., 2003. Molecular basis of barley quality. *Australian Journal of Agricultural Research* 54: 1081-1101.
- Giancola S., McKhann H. I., Berard A., Camillieri C., Durand S., Libeau P., Roux F., Reboud X., Gut R. J., Brunel D., 2006. Utilization of the three high-throughput SNP genotyping methods, the GOOD assay, Ampliflour and TaqMan, in diploid and polyploid plants. *Theoretical and Applied Genetics* 112: 1115-1124.
- Gomez-Cadenas A., Verhey S. D., Holappa L. D., Shen Q., Ho T. H. D., Walker-Simmons M. K., 1999. An abscisic acid-induced protein kinase, PKABA1, mediates abscisic acid-suppressed gene expression in barley aleurone layers. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96: 1767-1772.
- Grando S., Baum M., Ceccarelli S., Goodchild A., Jaby El-Haramein F., Jahoor A., Backes G., 2005. QTLs for straw quality characteristics identified in recombinant inbred lines of a *Hordeum vulgare* × *Hordeum spontaneum* cross in a mediterranean environment. *Theoretical and Applied Genetics* 110: 688-695.
- Graner A., Jahoor A., Schondelmaier J., Siedler H., Pillen K., Fischbeck G., Wenzel G., Herrmann R. G., 1991. Construction of an RFLP map of barley. *Theoretical and Applied Genetics* 83: 250-256.
- Graner A., Thiel T., Zhang H., Potokina E., Prasad M., Perovic D., Kota R., Varshney R. K., Scholz U., Grosse I., Stein N., 2005. Molecular mapping in barley: shifting from the structural to the functional level. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding* 41: 81-88.
- Grauf R., 1996. Entwicklung von Methoden zur Frühselektion auf Malzqualität der Gerste. Dissertation TU-München.
- Haldane J. B., 1919. The combination of linkage values and the calculation of distance between the loci of linked factors. *Journal of Genetics* 8: 299-309.
- Haley C. S., Knott S. A., 1992. A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. *Heredity* 69: 315-324.
- Han F., Ullrich S. E., Chirat S., Menteur S., Jestin L., Sarrafi A., Hayes P. M., Jones B. L., Blake T. K., Wesenberg D. M., Kleinhofs A., Kilian A., 1995. Mapping of β -glucan content and β -glucanase activity loci in barley grain and malt. *Theoretical and Applied Genetics* 91: 921-927.
- Han F., Ullrich S. E., Clancy J. A., Jitkov V., Kilian A., Romagosa I., 1996. Verification of barley seed dormancy loci via linked molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics* 92: 87-91.

- Han F., Romagosa I., Ullrich S. E., Jones B. L., Hayes P. M., Wesenberg D. M., 1997a. Molecular marker-assisted selection for malting quality traits in barley. *Molecular Breeding* 3: 427-437.
- Han F., Ullrich S. E., Kleinhofs A., Jones B. L., Hayes P. M., Wesenberg D. M., 1997b. Fine structure mapping of the barley chromosome-1 centromere region containing malting-quality QTLs. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 903-910.
- Han F., Ullrich S. E., Clancy J. A., Romagosa I., 1999. Inheritance and fine mapping of a major barley seed dormancy QTL. *Plant Science* 143: 113-118.
- Hartl, L., Mohler V., Zeller F., Hsam S., Schweizer G., 1999. Identification of AFLP markers closely linked to powdery mildew resistance genes *Pm1c* and *Pm4a* in common wheat (*Triticum aestivum* L.) *Genome* 42: 322-329.
- Hartl L., Schweizer G., Herz M., Baumer M., 2000. Molekulargenetische Lokalisierung von QTL für die Malzqualität der Gerste. Tagungsband der 53. Jahrestagung der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs. 21.-23- November 2000. HBLFA Raumberg-Gumpenstein. Seiten: 117-122.
- Hayes P. M., Liu B. H., Knapp S. J., Chen F., Jones B., Blake T., Franckowiak J., Rasmusson D., Sorrells M., Ullrich S. E., Wesenberg D., Kleinhofs A., 1993. Quantitative trait locus effects and environmental interaction in a sample of North American barley germ plasm. *Theoretical and Applied Genetics* 87: 392-401.
- Hayes P. M., Castro A., Marquez-Cedillo L., Corey A., Henson C., Jones B. L., Kling J., Mather D., Matus I., Rossi C., 2003. Genetic diversity for quantitatively inherited agronomic and malting quality traits. In: Von Bothmer R., Van Hintum Th., Knüpffer H., Sato K. (eds). *Diversity in barley (Hordeum vulgare)*. Page 201-226. Elsevier Science B. V., Amsterdam.
- Hellewell K. B., Rasmusson D. C., Gallo-Meagher M., 2000. Enhancing yield of semidwarf barley. *Crop Science* 40: 352-358.
- Henry R. J., 1987. Pentosans and (1-3), (1-4)- β -glucan concentrations in endosperm and whole grain of wheat, barley, oats and rye. *Journal of Cereal Science* 6: 253-258.
- Henry R. J., 1988. The carbohydrates of barley grains. A review. *Journal of the Institute of Brewing* 94:71-78.
- Herz M. P., 2000. Kartierung quantitativ vererbter Eigenschaften einschließlich Brauqualität und Resistenz gegen Krankheiten mit molekularen Markern in Gerste. Dissertation TU-München.
- Herz M., Mikolajewski S., Hartl L., Baumer M., Schweizer G., 2005. Validation and prediction of malt quality by the use of molecular genetic methods. Proceedings of the 14th EBC - Congress, Prague, 14. – 19. May 2005.
- Herz M., Nickl U., Fink K., Henkelmann G., 2006. Faktorielle Sortenversuche Gerste Brauqualität und kornphysikalische Untersuchungen. Versuchsergebnisse aus Bayern. Editor: LFL, Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, Freising.
- Herz M., Krumnacker K., Mikolajewski S., Schweizer G., 2008. GABI MALT Subproject 3: Identification, functional analysis and marker development of candidate genes related to malting quality by cDNA-AFLP. Poster GABI Statusseminar 4.-6. März 2008. Potsdam.

- Hori K., Kobayashi T., Sato K., Takeda K., 2005. QTL analysis of fusarium head blight resistance using a high-density linkage map in barley. *Theoretical and Applied Genetics* 111: 1661-1672.
- Hori K., Sato K., Takeda K., 2007. Detection of seed dormancy QTL in multiple mapping populations derived from crosses involving novel barley germplasm. *Theoretical and Applied Genetics* 115: 869-876.
- Horvath H., Huang J., Wong O., Kohl E., Okita T., Kannangara C. G., Von Wettstein D., 2000. The production of recombinant proteins in transgenic barley. *Proceedings of the National Academy of Science* 97: 1914-1919.
- Hough J. S., 1985. The biotechnology of malting and brewing. In: *Cambridge Studies in Biotechnology I*. Cambridge University Press. Cambridge.
- Igartua E., Edney M., Rossnagel B. G., Spaner D., Legge W. G., Scoles G. J., Eckstein P. E., Penner G. A., Tinker N. A., Briggs K. G., Falk D. E., Mather D. E., 2000. Marker-based selection of QTL affecting grain and malt quality in two-row barley. *Crop Science* 40: 1426-1433.
- Izawa M., Kano Y., Koshino S., 1993. Relationship between structure and solubility of (1-3), (1-4)- β -glucan from barley. *Journal of the American Association of Brewing Chemists* 51: 123-127.
- Jaccoud D., Peng K., Feinstein D., Kilian A., 2001. Diversity Arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. *Nucleic Acids Research* 29. e25
- Jansen C., Stam P., 1994. High resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping. *Genetics* 136: 1447-1455.
- Jansen R. C., Nap J. P., 2001. Genetical Genomics: the added value from segregation. *Trends in Genetics* 17: 388-391.
- Kao C. H., Zeng Z. B., Teasdale R. D., 1999. Multiple interval mapping for quantitative trait loci. *Genetics* 152: 1203-1216.
- Karakousis A., Gustafson J. P., Chalmers K. J., Barr A. R., Langridge P., 2003. A consensus map of barley integrating SSR, RFLP and AFLP markers. *Australian Journal of Agricultural Research* 54: 1173-1185.
- Kearsey M. J., Farquhar A. G. L., 1998. QTL analysis in plants, where are we now? *Heredity* 80: 137-142.
- Kessler M., 2006. Analytische Erfassung und Interpretation der Stärkedegradation im Gersten- und Malzkorn und die Aussagekraft für den Brauprozess. Dissertation TU-München.
- Kihara M., Okada Y., Kuroda H., Saeki K., Yoshigi N., Ito K., 2000. Improvement of β -amylase thermostability in transgenic barley seeds and transgene stability in progeny. *Molecular Breeding* 6: 511-517.
- Kipp A., 1998. QTL-Kartierung von Mälzeigenschaften in einer Sommergerstenkreuzung (*Hordeum vulgare* L.). Dissertation Universität Giessen.

- Kleinhofs A., Kilian A., Sagai Maroof M. A., Biyashev R. M., Hayes P., Chen F. Q., Lapitan N., Fenwick A., Blake T. K., Kanazin V., Ananiev E., Dahleen L., Kudrna D., Bollingen J., Knapp S. J., Liu B., Sorrells M. E., Heun M., Franckowiak J. D., Hoffman D., Skadsen R., Steffenson B. J., 1993. A molecular isozyme and morphological map of the barley (*Hordeum vulgare*) genome. *Theoretical and Applied Genetics* 86: 705-712.
- Kleinhofs A., Graner A., 2000. The Barley Bin map. <http://barleygenomics.wsu.edu>.
- Knapp S. J., Bridges W. C., 1987. Confidence interval estimates for heritability for several mating and experimental designs. *Theoretical and Applied Genetics* 73: 759-763.
- Knapp S. J., Bridges W. C., 1990. Using molecular markers to estimate quantitative trait locus parameters: Power and genetic variances for unreplicated and replicated progeny. *Genetics* 126: 769-777.
- Komatsuda T., Pourkheirandish M., He C., Azhaguvel P., Kanamori H., Perovic D., Stein N., Graner A., Wicker T., Tagiri A., Lundquist U., Fujimara T., Matsouka M., Matsumoto T., Yano M., 2007. Six-rowed barley originated from a mutation in a homeodomain-leucine zipper I-class homeobox gene. *Proceedings of National Academy of Sciences of the USA* 104: 1424-1429.
- Korol A., Ronin Y., Minkov D., Britvin E., Mester D., Korostishevsky M., Malkin I., Frenkel Z., Orion O., Brailovsky A., 2005. MultiQTL version 2.5. Institute of Evolution, Haifa University, Haifa, Israel.
- Korrell M., Eschholz T. W., Eckey C., Biedenkopf D., Marc K., Kogel K.H., Friedt W., Ordon F., 2008. Development of a cDNA-AFLP derived CAPS marker co-segregating with the powdery mildew resistance gene *Mlg* in barley. *Plant Breeding* 127: 102-104.
- Korstanje R., Paigen B., 2002. From QTL to gene: the harvest begins. *Nature Genetics* 31: 235-236.
- Kota R., Varshney R. K., Thiel T., Dehmer K. J., Graner A., 2001. Generation and comparison of EST-derived SSRs and SNPs in barley (*H. vulgare* L.). *Hereditas* 135: 145-151.
- Kota R., Varshney R. K., Prasad M., Zhang H., Stein N., Graner A., 2007. EST-derived single nucleotide polymorphism markers for assembling genetic and physical maps of the barley genome. *Functional and Integrative Genomics*. DOI 10.1007/S10142-007-0060-9.
- Kraakman A. T. W., Niks R. E., Van den Berg P. M. M. M., Stam P., Van Eeuwijk F. A., 2004. Linkage disequilibrium mapping of yield and yield stability in modern spring barley cultivars. *Genetics* 168: 435-446.
- Kuo A., Cappelluti S., Cervantes-Cervantes M., Rodriguez M., Bush D. S., 1996. Ocadaic acid, a protein phosphatase inhibitor, blocks calcium changes, gene expression and cell death induced by gibberellin in wheat aleurone cells. *Plant Cell* 8: 259-269.
- Lander E. S., Botstein D., 1989. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121: 185-199.
- Langridge P., Barr A. R., 2003. Preface to „Better Barley Faster: The role of marker assisted selection“. *Australian Journal of Agricultural Research* 54: i-iv.

- Lapitan N., Botha-Oberholster A. M., Close T. J., Lawrence C., 2006. Transcriptional profiling of gene expression during malting in barley. [http://www1.agric.gov.ab.ca/\\$department/deptdocs.nsf/all/fcd10197](http://www1.agric.gov.ab.ca/$department/deptdocs.nsf/all/fcd10197).
- Laurie D. A., Pratchett N., Romero C., Simpson E., Snape J. W., 1993. Assignment of the *denso* dwarfing gene to the long arm of chromosome 3 (3H) of barley by use of RFLP markers. *Plant Breeding* 111: 198-203.
- Leymarie J., Bruneaux E., Gibot-Leclerc S., Corbineau F., 2007. Identification of transcripts potentially involved in barley seed germination and dormancy using cDNA-AFLP. *Journal of Experimental Botany* 58: 425-437.
- Li C. D., Tarr A., Lance R. C. M., Harasymow S., Uhlmann J., Westcot S., Young K. J., Grime C. R., Cakir M., Broughton S., Appels R., 2003a. A major QTL controlling seed dormancy and pre-harvest sprouting/grain α -amylase in two-rowed barley (*Hordeum vulgare* L.). *Australian Journal of Agricultural Research* 54: 1303-1313.
- Li C., Ni P., Francki M., Hunter A., Zhang Y., Schibeci D., Li H., Tarr A., Wang J., Cakir M., Yu J., Bellgard M., Lance R., Appels R., 2004. Genes controlling seed dormancy and pre-harvest sprouting in a rice-wheat-barley comparison. *Functional and Integrative Genomics*. 4: 84-93.
- Li, J. Z., Sjakste T. G., Röder M. S., Ganal M. W., 2003b. Development and genetic mapping of 127 new microsatellite markers in barley. *Theoretical and Applied Genetics* 107: 1021-1027.
- Li J. Z., Huang X. Q., Heinrichs F., Ganal M. W., Röder M. S., 2005. Analysis of QTLs for yield, yield components and malting quality in a BC₃-DH population of spring barley. *Theoretical and Applied Genetics* 110: 356-363.
- Liu Z. W., Biyashev R. M., Saghai Maroof M., A., 1996. Development of simple sequence repeat DNA markers and their integration into a barley linkage map. *Theoretical and Applied Genetics* 93: 869-876.
- Livak K. J., Flood S. J., Marmaro J., Giusti W., Deetz K., 1995. Oligonucleotids with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridisation. *PCR Methods Application* 4: 357-362.
- Livak K. J., 1999. Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay. *Genetic Analysis* 14: 143-149.
- Lovegrove A., Hooley R., 2000. Gibberellin and abscisic acid signalling in aleurone. *Trends in Plant Science* 5: 102-110.
- Lundquist U., Franckowiak J. D., Konishi T., 1997. New and revised descriptions of barley genes. *Barley Genetics Newsletter* 26: 22-33.
- MacGregor A., 1991. The effect of barley structure and composition on malt quality. *EBC congress 1991*: 37-47.
- Malysheva-Otto L. V., Ganal M. W., Röder M. S., 2006. Analysis of molecular diversity, population structure and linkage disequilibrium in a worldwide survey of cultivated barley germplasm (*Hordeum vulgare* L.). *BMC Genetics* 7: 6.

- Marquez-Cedillo L. A., Hayes P. M., Jones B. L., Kleinhofs A., Legge W. G., Rossnagel B. G., Sato K., Ullrich E., Wesenberg D. M., 2000. QTL analysis of malting quality in barley based on the doubled-haploid progeny of two elite North American varieties representing different germplasm groups. *Theoretical and Applied Genetics* 101: 173-184.
- Mather D. E., Tinker N. A., LaBerge D. E., Edney M., Jones B. L., Rossnagel B. G., Legge W. G., Briggs K. G., Irvine R. B., Falk D. E., Kasha K. J., 1997. Regions of the genome that affect grain and malt quality in a North American two-row barley cross. *Crop Science* 37: 544-554.
- Matthews P. R., Wang M. B., Waterhouse P. M., Thornton S., Fieg S. J., Gubler F., Jacobsen J. V., 2001. Marker gene elimination from transgenic barley, using co-transformation with adjacent "twin T-DNAs" on a standard *Agrobacterium* transformation vector. *Molecular Breeding* 7: 195-202.
- Matthies I., Röder M. S., 2006. Haplotypendiversität von Kandidatengenomen mit Einfluss auf die Malzqualität in Gerste. Tagungsband der 57. Jahrestagung der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs. 21.-23- November 2006. HBLFA Raumberg-Gumpenstein, Seiten: 61-63.
- Matthies I., Weise S., Röder M. S., 2009. Association of haplotype diversity in the α -amylase gene *amy1* with malting quality parameters in barley. *Molecular breeding* 23: 139-152.
- McCubbin A. G., Ritchie S. M., Swanson S. J., Gilroy S., 2004. The calcium-dependent protein kinase HvCDPK1 mediates the gibberellic acid response of the barley aleurone through regulation of vacuolar function. *Plant Journal* 39: 206-218.
- MEBAK. (1997). Brautechnologische Analysemethoden, Methodensammlung der Mitteleuropäischen Brautechnischen Analysenkommission. Selbstverlag der MEBAK. 85350 Freising-Weißenstephan.
- Melchinger A. E., Utz H. F., Schön C. C., 1998. Quantitative trait locus (QTL) mapping using different testers and independent population samples in maize reveals a low power of QTL detection and a large bias in estimates of QTL effects. *Genetics* 149: 383-403.
- Meyer M., 2005. A comparison of regression interval mapping and multiple interval mapping for linked QTL. *Heredity* 94: 599-605.
- Michalek W., 2006. Molekulare Marker: Technologie und Anwendung. Tagungsband der 57. Jahrestagung der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs, 21-23. November 2006, HBLFA Raumberg-Gumpenstein, Seite 21-22.
- Michiels A., Tucker M., Van den Ende W., Van Laere A., 2003. Chromosome walking of flanking regions from short known sequences in GC-rich plant genomic DNA. *Plant Molecular Biology Reporter* 21: 295-302.
- Mikolajewski S., Herz M., Pichlmaier K., Schweizer G., Baumer M., 2002. Untersuchung differentieller Genexpression im Verlauf der Vermälzung von Gerstenkörnern- ein Vergleich von Brau- und Futtergerstensortenmittels cDNA-AFLP-Technik. Vorträge Pflanzenzüchtung 54: 405-408.
- Mikolajewski S., Hanemann A., Herz M., Schweizer G. 2005. Development of a CAPS marker derived from a *hsp70* homologous differential TDF obtained by cDNA-AFLP analysis concerning malting quality of barley. Poster presentation. 4. PlantGEMs. Amsterdam. 20.-23. September 2005.

- Molina-Cano J. L., Francesch M., Perez-Vendrell A. M., Ramo T., Voltas J., Brufau J., 1997. Genetic and environmental variation in malting and feed quality of barley. *Journal of Cereal Science* 25: 37-47.
- Molina-Cano J. L., Moralejo M., Elia M., Munoz P., Russell J. R., Perez-Vendrell A. M., Ciudad F., Swanston J. S., 2007. QTL analysis of a cross between european and north american malting barleys reveals a putative candidate gene for β -glucan content on chromosome 1H. *Molecular Breeding* 19: 275-284.
- Moon J., Parry G., Estelle M., 2004. The Ubiquitin-Proteasome pathway and plant development. *The Plant Cell* 16: 3181-3195.
- Moralejo M., Swanston J. S., Munoz P., Prada D., Elia M., Russell J. R., Ramsey L., Cistue L., Codesal P., Casas A. M., Romagosa I., Powell W., Molina-Cano J. L., 2004. Use of new EST markers to elucidate the genetic differences in grain protein content between European and North American two-rowed malting barleys. *Theoretical and Applied Genetics* 110: 116-125.
- Munck L., 1987. Quality assessment of brewing barley varieties. *EBC congress 1987*: 145-156.
- Murray F., Matthews P., Jacobsen J., Gubler F., 2006. Increased expression of HvGAMYB in transgenic barley increases hydrolytic enzyme production by aleurone cells in response to gibberellin. *Journal of Cereal Science* 44: 317-322.
- Narziss L., 1999. *Die Technologie der Malzbereitung*. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.
- Nicolas C., Nicolas G., Rodriguez D., 1998. Transcripts of a gene, encoding a small GTP-binding protein from *Fagus sylvatica*, are induced by ABA and accumulated in the embryonic axis of dormant seeds. *Plant Molecular Biology* 36: 487-491.
- Nuutila A. M., Ritala A., Skadsen R. W., Mannonen L., Kauppinen V., 1999. Expression of fungal thermotolerant endo-1,4- β -glucanase in transgenic barley seeds during germination. *Plant Molecular Biology* 41: 777-783.
- Oziel A., Hayes P. M., Chen F. Q., Jones B., 1996. Application of quantitative trait locus mapping to the development of winter-habit malting barley. *Plant Breeding* 115: 43-51.
- Palmer G. H., 1983. Malting and mashing. In: *An introduction to brewing and science technology*. Pages: 10-27. The Institute of Brewing. London.
- Panozzo J. F., Eckermann P. J., Mather D. E., Moody D. B., Black C. K., Collins H. M., Barr A. R., Lim P., Cullis B. R., 2007. QTL analysis of malting quality traits in two barley populations. *Australian Journal of Agricultural Research* 58: 858-866.
- Paris M., Jones M. G. K., Eglinton J. K., 2002. Genotyping a single nucleotide polymorphism for selection of barley β -amylase alleles. *Plant Molecular Biology Reporter* 20: 149-159.
- Paterson A. H., DeVerna J., Lanini B., Tanksley S. D., 1990. Fine mapping of quantitative trait loci using selected overlapping recombinant chromosomes in an interspecific cross of tomato. *Genetics* 124: 735-742.
- Pillen K., Binder A., Kreuzkam B., Ramsey L., Waugh R., Förster J., Leon J., 2000. Mapping new EMBL-derived barley mikrosatellites and their use in differentiating german barley cultivars. *Theoretical and Applied Genetics* 101: 652-660.

- Potokina E., Sreenivasulu N., Altschmied L., Michalek W., Graner A., 2002. Differential gene expression during seed germination in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Functional and Integrative Genomics* 2: 28-39.
- Potokina E., Caspers M., Prasad M., Kota R., Zhang H., Sreenivasulu N., Wang M., Graner A., 2004. Functional association between malting quality trait components and cDNA array based expression patterns in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Molecular Breeding* 14: 153-170.
- Potokina E., Prasad M., Malysheva L., Röder M. S., Graner A., 2006. Expression genetics and haplotype analysis reveal *cis* regulation of serine carboxypeptidase I (*Cxp1*), a candidate gene for malting quality in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Functional and Integrative Genomics* 6: 25-35.
- Potokina E., Druka A., Luo Z., Wise R., Waugh R., Kearsey M., 2008. Gene expression quantitative trait locus analysis of 16 000 barley genes reveals a complex pattern of genome-wide transcriptional regulation. *The Plant Journal* 53: 90-101.
- Powell W., Caligari P. D. S., Thomas W. T. B., Jinks J. L., 1985. The effects of major genes on quantitatively varying characters in barley 2. The denso and daylength response loci. *Heredity* 54: 349-352.
- Powell W., Thomas W. T. B., Baird E., Lawrence P., Booth A., Harrower B., McNicol J. W., Waugh R., 1997. Analysis of quantitative traits in barley by the use of Amplified Fragment Length Polymorphisms. *Heredity* 79: 48-59.
- Prada D., Ullrich S.E., Molina-Cano J. L., Cistue L., Clancy J. A., Romagosa I., 2004. Genetic control of dormancy in a Triumph/Morex cross in barley. *Theoretical and Applied Genetics* 109: 62-70.
- Promega Corporation. 1996. *Protocols and Application Guide*. 3. Auflage. Madison. USA
- Qi X., Stam P., Lindhout P., 1998. Use of locus-specific AFLP markers to construct a high-density molecular map in barley. *Theoretical and Applied Genetics* 96: 376-384.
- Rae S. J., Macaulay M., Ramsey L., Leigh F., Matthews D., O'Sullivan D. M., Donini P., Morris P. C., Powell W., Marshall D. F., Waugh R., Thomas W. T. B., 2007. Molecular barley breeding. *Euphytica* 158: 295-303.
- Ramsey L., Macaulay M., Degli Ivanissevich S., MacLean K., Cardle L., Fuller J., Edwards K. J., Tuveesson S., Morgante M., Massari A., Maestri E., Marmiroli N., Sjakste T., Ganai M., Powell W., Waugh R., 2000. A Simple Sequence Repeat-based linkage map of barley. *Genetics* 156: 1997-2005.
- Ritchie S., Gilroy S., 1998. Tansley Review No. 100. Gibberellins: regulating genes and germination. *New Phytologist* 140: 363-383.
- Ritter E., Ruiz de Galarreta J. I., Van Eck H. J., Sanchez I., 2008. Construction of a potato transcriptome map based on the cDNA-AFLP technique. *Theoretical and Applied Genetics* 116: 1003-1013.
- Robertson M., 2004. Two transcription factors are negative regulators of gibberellin response in the HvSPY-signaling pathway in barley aleuron. *Plant Physiology* 136: 2747-2761.

- Romagosa I., Han F., Clancy J. A., Ullrich S. E., 1999. Individual locus effects on dormancy during seed development and after-ripening in barley. *Crop Science* 39: 74-79.
- Rostoks N., Mudie S., Cardle L., Russell J., Ramsey L., Booth A., Svensson J. T., Wanamaker S. J., Walio H., Rodriguez E. M., Hedley P. E., Liu H., Morris J., Close T. J., Marshall D. F., Waugh R., 2005. Genome-wide SNP discovery and linkage analysis in barley based on genes responsive to abiotic stress. *Molecular Genetics and Genomics* 274: 515-527.
- Rostoks N., Ramsey L., MacKenzie K., Cardle L., Bhat P. R., Roose M. L., Svensson J. T., Stein N., Varshney R. K., Marshall D. F., Graner A., Close T. J., Waugh R., 2006. Recent history of artificial outcrossing facilitates whole-genome association mapping in elite inbred crop varieties. *Proceedings of the North American Society* 103: 18656-18661.
- Russell, J., Fuller J.D., Young G., Thomas B., Taramino G., Macaulay M., Waugh R., Powell W., 1997. Discriminating between barley genotypes using microsatellite markers. *Genome* 40: 442-450.
- Salamini F., Özkan H., Brandolini A., Schäfer-Pregl R., Martin W., 2002. Genetics and geography of wild cereal domestication in the near east. *Nature Reviews Genetics* 3: 429-441.
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T., 1989. *Molecular cloning, A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2. Auflage.
- SAS Institute Inc., 2004, *SAS 9.1 Qualification tools users guide*, Cary N. C.
- Sasaki A., Ashikari M., Ueguchi-Tanaka M., Itoh H., Nishimura A., Swapan D., Ishiyama K., Saito T., Kobayashi M., Khush G. S., Kitano H., Matsuoka M., 2002. A mutant gibberellin-synthesis gene in rice. *Nature* 416: 701.
- Sax K., 1923. The association of size differences with seed-coat pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. *Genetics* 8: 552-560.
- Schena M., Shalon D., Davis R. W., Brown P. O., 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270: 467-470.
- Schildbach R., 1971. Protein content of barley and beer quality. *Proceedings EBC* 13: 83-94.
- Seefried F., 2007. Identifizierung und Charakterisierung von Kandidatengenen für Milchleistungsmerkmale bei den Rinderrassen Fleckvieh und Braunvieh. *GenomXpress* 1/07: 10-11.
- Shan X., Blake T. K., Talbert L. E., 1999. Conversion of AFLP markers to sequence-specific PCR markers in barley and wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 1072-1078.
- Smith D., Starr C., Parsons D., Freeman R., 1987. Barley β -glucans. *Annual Report of the Plant Breeding Institute*. 1986. Cambridge UK: 117-118.
- Soller M., Brody T., Genizi A., 1976. On the power of experimental designs for the detection of linkage between marker loci and quantitative loci in crosses between inbred lines. *Theoretical and Applied Genetics* 47: 35-39.
- Spielmeier W., Ellis M., Chandler P., 2002. Semidwarf (sd-1), green revolution rice, contains a defective gibberellin 20-oxidase gene. *Proceedings of the National Academies Science USA* 99: 9043-9048.

- Spielmeier W., Ellis M., Robertson M., Ali S., Lenton J., Chandler P., 2004. Isolation of gibberellin metabolic pathway genes from barley and comparative mapping in barley, wheat and rice. *Theoretical and Applied Genetics* 109: 847-855.
- Sreenivasulu N., Radchuk V., Strickert M., Miersch O., Weschke W., Wobus U., 2006. Gene expression patterns reveal tissue-specific signaling networks controlling programmed cell death and ABA-regulated maturation in developing barley seeds. *The Plant Journal* 47: 310-327.
- Sreenivasulu N., Graner A., Wobus U., 2008. Barley Genomics: An Overview. *International Journal of Plant Genomics* 108: Article ID: 486258. doi:10.1155/2008/486258.
- Stein N., Prasad M., Scholz U., Thiel T., Zhang H., Wolf M., Kota R., Varshney R. K., Perovic D., Grosse I., Graner A., 2006. A 1.000-loci transcript map of the barley genome: new anchoring points for integrative grass genomics. *Theoretical and Applied Genetics* 114: 823-839.
- Struss, D., Plieske J., 1998. The use of mikrosatellite markers for detection of genetic diversity in barley populations. *Theoretical and Applied Genetics* 97: 308-315.
- Sung D. Y., Kaplan F., Guy C. 2001. Plant Hsp70 molecular chaperones: Protein structure, gene family, expression and function. *Physiologia Plantarum* 113: 443-451.
- Swanston J. S., Thomas W. T. B., Powell W., Young G. R., Lawrence P. E., Ramsey L., Waugh R., 1999. Using molecular markers to determine barleys most suitable for malt whisky distilling. *Molecular Breeding* 5: 103-109.
- Tanksley S. D., Nelson J. C., 1996. Advanced Backcross QTL analysis: a method of simultaneous discovery and transfer of valuable QTLs from unadapted germplasm into elite breeding lines. *Theoretical and Applied Genetics*: 92: 191-203.
- Thiel T., Michalek W., Varshney R. K., Graner A., 2003. Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*H. vulgare* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 106: 411-422.
- Thomas W. T. B., Powell W., Swanston J. S., 1991. The effects of major genes on quantitatively varying characters in barley. 4. The *GPert* and *denso* loci and quality characters. *Heredity* 66: 381-389.
- Thomas W. T. B., Powell W., Waugh R., Chalmers K. J., Barua U. M., Jack P., Lea V., Forster B. P., Swanston J. S., Ellis R. P., Hanson P. R., Lance R. C. M., 1995. Detection of quantitative trait loci for agronomic, yield, grain and disease characters in spring barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 91: 1037-1047.
- Thomas W. T. B., Powell W., Swanston J. S., Ellis R. P., Chalmers K. J., Barua U. M., Jack P., Lea V., Forster B. P., Waugh R., Smith D. B., 1996. Quantitative trait loci for germination and malting quality characters in a spring barley cross. *Crop Science* 36: 265-273.
- Thomas W. T. B., 2003. Prospects for molecular breeding of barley. *Annual and applied Biology* 142: 1-12.
- Toorop P. E., Barroco R. M., Engler G., Groot P. C., Hilhorst H. W. M., 2005. Differentially expressed genes associated with dormancy or germination of *Arabidopsis thaliana* seeds. *Planta* 221: 637-647.

- Ullrich S. E., Hayes P. M., Dyer W. E., Blake T. K., Clancy J. A., 1993. Quantitative trait locus analysis of seed dormancy in "Steptoe" barley. In: Walker-Simmons M. K., Reid J. L. (eds). Proceedings of the 6th International Symposium on Pre-harvest sprouting Cereals. The American Association of Cereal Chemists. Pages: 136-145. St. Paul, Minnesota.
- Ulonska E., Fritz A., Lenz W., 1966. Die Kleinmälzungsanlage der Braugerstengemeinschaft an der Bayerischen Landessaatzuchtanstalt Weihenstephan, ihre Einrichtung und Arbeitsmethoden. Brauwissenschaft 19: 217-233.
- Utz H. F., 2001. PLABSTAT: ein Computerprogramm zur statistischen Analyse von pflanzenzüchterischen Experimenten, Version 2P. Institut für Pflanzenzüchtung, Universität Hohenheim, Stuttgart, Deutschland.
- Van Ooijen J. W., Voorrips R. E., 2001. Joinmap 3.0, Software for the calculation of genetic linkage maps. Plant Research International, Wageningen, Netherlands, pp.1-51.
- Varshney R. K., Grosse I., Hähnel U., Siefken R., Prasad M., Stein N., Langridge P., Altschmied L., Graner A., 2006. Genetic mapping and BAC assignment of EST-derived SSR markers shows non-uniform distribution of genes in the barley genome. Theoretical and Applied Genetics 113: 239-250.
- Varshney R. K., Langridge P., Graner A., 2007a. Application of genomics to molecular breeding of wheat and barley. Advances in Genetics 58:121-155.
- Varshney R. K., Marcel T. C., Ramsey L., Russell J., Röder M. S., Stein N., Waugh R., Langridge P., Niks R. E., Graner A., 2007b. A high density barley microsatellite consensus map with 775 SSR loci. Theoretical and Applied Genetics 114: 1091-1103.
- Velculescu V. E., Zhang L., Vogelstein B., Kinzler K. W., 1995. Serial analysis of gene expression. Science 270: 484-487.
- Von Bothmer R., Jacobsen N., Baden C., Jorgensen R. B., Linde-Lausen I., 1995. An ecogeographical study of the genus *Hordeum*. 2nd edition. Systematic and Ecogeographical studies on Crop Gene pools. 7. International Plant Genetics Resources Institute, Rome.
- Von Korff M., Wang H., Leon J., Pillen K., 2006. AB-QTL analysis in spring barley: II. Detection of favourable exotic alleles for agronomic traits introgressed from wild barley (*H. vulgare* ssp. *spontaneum*). Theoretical and Applied Genetics 112: 1221-1231.
- Von Korff M., Wang H., Leon J., Pillen K., 2008. AB-QTL analysis in spring barley: III. Identification of exotic alleles for the improvement of malting quality in spring barley (*Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*). Molecular Breeding 21: 81-93.
- Von Wettstein-Konowles P., 1992. Cloned and mapped genes: current status. In: Shewry P. R. (ed). Barley: genetics, biochemistry, molecular biology and biotechnology. Pages: 73-98. CAB International Wallingford. UK.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans T., Van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M., 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. Nucleotid Acids Research 23: 4407-4414.
- Vuylsteke M., Van Den Daele H., Vercauteren A., Zabeau M., Kuiper M., 2006. Genetic dissection of transcriptional regulation by cDNA-AFLP. The Plant Journal 45: 439-446.

- Wang Z., Weber J. L., Zhong G., Tanksley S. D., 1994. Survey of plant short tandem repeats. *Theoretical and Applied Genetics* 88: 1-6.
- Wang D. G., Fan J. B., Siao C. J., Berno A., Young P., Sapolsky R., Ghandour G., Perkins N., Winchester E., Spencer J., Kruglyak L., Stein L., Hsie L., Topaloglou T., Hubbell E., Robinson E., Mittmann M., Marlis M. S., Shen N., Kilburn D., Rioux J., Nusbaum C., Rozen S., Hudson T. J., Lipshutz P., Chee M., Lander E. S., 1998. Large-scale identification, mapping and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science* 280: 1077-1082.
- Watson L., Henry R. J., 2005. Microarray analysis of gene expression in germinating barley embryos (*Hordeum vulgare* L.). *Functional and Integrative Genomics* 5: 155-162.
- Wenzl P., Li H., Carling J., Zhou M., Raman H., Paul E., Hearnden P., Maier C., Xia L., Caig V., Ovesna J., Cakir M., Poulsen D., Wang J., Raman R., Smith K. P., Muehlbauer G. J., Chalmers K. J., Kleinhofs A., Huttner E., Kilian A., 2006. A high-density consensus map of barley linking DArT markers to SSR, RFLP and STS loci and agricultural traits. *BMC Genomics* 7: 206.
- Weschke W., Mock H. P., Pietsch C., Volodymyr R., Röder M., Schreiber F., Seiffert U., Sreenivasulu N., Strickert M., Witzel K., Wobus U., 2007. „Genetical Genomics“ der Gerstenkornentwicklung- von der Genexpression zu landwirtschaftlich bedeutsamen Merkmalen. *GenomXPress* 1/07: 12-16.
- West M. A. L., Kim K., Kliebenstein D. J., Van Leeuwen H., Michelmore R. W., Doerge R W., St. Clair D., 2007. Global eQTL Mapping reveals the Complex Genetic Architecture of Transcript-Level Variation in Arabidopsis. *Genetics* 175: 1441-1450.
- White C. N., Proebsting W. M., Hedden P., Rivin C. J., 2000. Gibberellins and seed development in maize. I. Evidence that gibberellin/abscisic balance governs germination versus maturation pathways. *Plant Physiology* 122: 1081-1088.
- White J., Pacey-Miller T., Crawford A., Cordeiro G., Barbary D., Bundock P., Henry R., 2006. Abundant transcripts of malting barley identified by serial analysis of gene expression (SAGE). *Plant Biotechnology Journal* 4: 289-301.
- Yin X., Stam P., Dourleijn C. J., Kropff M. J., 1999. AFLP mapping of quantitative trait loci for yield-determining physiological characters in spring barley. *Theoretical and Applied Genetics* 99: 244-253.
- Zabeau M., Vos P., 1993. Keygene, Wageningen. In European Patent Application, Publication Nr. 0534 858 A.1.
- Zale J. M., Clancy J. A., Ullrich S. E., Jones B. L., Hayes P. M., 2000. North American Barley Genome Mapping Project. Summary of barley malting quality QTLs mapped in various populations. *Barley Genetic Newsletter* 30: 44-54.
- Zeng Z. B., 1994. Precise mapping of quantitative trait loci. *Genetics* 136: 1457-1468.
- Zhang J., Yong X., Moolhuijzen P., Beelgard M., Lance R., Appels R., Li C., 2005. Towards Isolation of the Green Revolution Gene [http://www.cdesign.com.au/proceedings_abts2005/posters20%\(pdf\)/poster_li.pdf](http://www.cdesign.com.au/proceedings_abts2005/posters20%(pdf)/poster_li.pdf).

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
AB	Advanced Backcross
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
BSA	Bulked Segregant Analysis
BSA	Bundessortenamt
C	Cytosin
CAPS	Cleaved Amplified Polymorphic Sequence
CCD	Charge-coupled Device
cDNA	copyDNA
cDNA-AFLP	copyDNA- Amplified Fragment Length Polymorphism
CIM	Composite Interval Mapping
cM	centi Morgan
DArT	Diversity Arrays Technology
DBE	Dextrinbildungseinheiten
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DH	Doppelhaploid
D-HPLC	Denaturing High-Performance Liquid Chromatography
DNA	Desoxyribonucleic Acid
DNase	Desoxyribonuclease
dNTPs	Desoxynucleotide (= Desoxynucleosid 5'-triphosphate)
ds	double-stranded
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eQTL	expression Quantitative Trait Loci
EST	Expressed Sequence Tag
G	Guanin
INDEL	Insertion/Deletion
IPK	Institut f. Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung Gatersleben
LB	Luria-Bertani Medium
LD	Linkage Disequilibrium

LFL	Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft
LOD	Logarithm Of Odds
MAS	Marker assisted selection
mRNA	messenger RNA
mBar	Millibar
MEBAK	Mitteleuropäische Brautechnologische Analysekommission
MIM	Multiple Interval Mapping
MOPS	2-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mPas	MilliPascal
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NILs	Near Isogenic Lines (Nahisogene Linien)
Nm	Newtonmeter
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerase Chain Reaction
pQTL	protein Quantitative Trait Loci
QTL	Quantitative Trait Loci
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA	Ribonucleic Acid
RNase	Ribonuklease
Rpm	Rounds per minute
SAGE	Serial Analysis of Gene Expression
SIM	Simple Interval Mapping
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SSR	Simple Sequence Repeat/ Mikrosatelliten
STS	Sequence Tagged Site
T	Thymin
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris + Borsäure + EDTA
TDF	Transcript derived Fragment
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethyl-Ethylendiamin
TIGR	The Institute for Genomic Research
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminometan

8.2 Chemikalienverzeichnis

Enzyme

DNaseI	Roche, Mannheim
<i>EcoRI</i>	Biolabs, Schwalbach
Hot Start <i>Taq</i> -Polymerase (SNP-Analyse)	ABgene, England
<i>MseI</i>	Biolabs, Schwalbach
Proteinase K	Roche, Mannheim
<i>PstI</i>	Biolabs, Schwalbach
RNase	Roth, Karlsruhe
<i>Taq</i> -Polymerase	Eurogentec, Belgien
T4-DNA Ligase	Biolabs, Schwalbach

Oligos

<i>MseI</i> -Adapter	Amersham, Braunschweig
<i>Mse</i> -Primer	Biomers, Ulm
<i>Mse00</i> -Primer	Biomers, Ulm
<i>PstI</i> -Adapter	Amersham, Braunschweig
<i>Pst</i> -Primer	Biomers, Ulm
<i>Pst03</i> -Primer	Biomers, Ulm
Sequenzierprimer	Biomers, Ulm
SNP-Primer (Forward- und Reverse)	Biomers, Ulm
SSR-Primer (Forward- und Reverse)	Biomers, Ulm

Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid)(19:1)	Roth, Karlsruhe
Agar	Merck, Darmstadt
Agarose	Merck, Darmstadt
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Annealing Puffer	Biotage, Schweden
APS	Merck, Darmstadt
ATP	Roth, Karlsruhe
Binding Puffer	Biotage, Schweden
Borsäure	MP Biomedicals, Ohio
Bromphenolblau	Pharmacia Biotech, Freiburg
BSA	Amersham, Braunschweig
Chloroform-Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
DEPC	Sigma-Aldrich
DMF	Sigma-Aldrich
dNTPs	Roth, Karlsruhe

EDTA	Merck, Darmstadt
Ethanol	J.T. Baker, Niederlande
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd	Sigma-Aldrich
Formamid	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Harnstoff	ICN Biomedicals, Ohio
Hefeextrakt	Sigma-Aldrich
High Performance Puffer (SNP-Analyse)	ABgene, England
IPTG	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Merck, Darmstadt
MgCl ₂ (SNP-Analyse)	ABgene, England
MgCl ₂	Eurogentec, Belgien
MOPS	Sigma-Aldrich
PCR Puffer	Eurogentec, Belgien
NaCl	Merck, Darmstadt
Natriumbisulfit	Merck, Darmstadt
Natriumacetat-Trihydrat	Merck, Darmstadt
NaOH	Merck, Darmstadt
NaAc	J.T. Baker, Niederlande
NEB2Puffer	Biolabs, Schwalbach
NEB4Puffer	Biolabs, Schwalbach
NEBPuffer <i>EcoRI</i>	Biolabs, Schwalbach
Pepton	Roth, Karlsruhe
SDS	Merck, Darmstadt
Soc-Medium	Qiagen, Hilden
Streptavidin-Sepharose	Amersham, Freiburg
TRIS	ICN Biomedicals, Ohio
TEMED	Merck, Darmstadt
Xylencyanol FF	Merck, Darmstadt
X-Gal	Roth, Karlsruhe

8.3 Basislösungen

DEPC-H₂O

0,1% DEPC

x H₂O_{bidest}

Inkubation ü.N. bei 20°C, anschl. 2× autoklavieren

TE-Puffer

10 mM TRIS, pH 8

1 mM EDTA, pH 8

10 x TBE-Puffer

0,89 M Tris, pH 8,0

0,89 M Borsäure

0,5 m EDTA, pH 8,0

8.4 Lösungen für einzelne Arbeitsgänge**DNA-Isolation**

Extraktionspuffer (Anderson et al. 1992)

100 mM TRIS

50 mM EDTA

500 mM Natriumchlorid

10% SDS

3,8 g/l Natriumbisulfit (frisch zugegeben)

Wachlösung 1

76% Ethanol

0,2 M Natriumacetat-Trihydrat

Waschlösung 2

76% Ethanol

10 mM Ammoniumacetat

SNP-Analysen

Denaturierungslösung

0,2 M NaOH

Waschpuffer pH 7,6

10 mM Tris

FA-Agarose Gelelektrophorese***1,5%iges RNA-Gel (90 ml)***

1,35 g Agarose

56 ml DEPC-H₂O

18 ml 5× RNA-Elektrophoresepuffer

15,9 ml Formaldehyd

5×RNA-Elektrophoresepuffer

200 ml 0,5 M MOPS ph7

8,3 ml 3 M Na-Acetat ph5,2

5 ml 0,5 M EDTA ph 8

286,7 ml DEPC-H₂O

RNA-Beladungsfarbstoff

0,25% Bromphenolblau

0,25% Xylencyanol FF

30% Glycerin in H₂O

RNA-Beladungspuffer (1 Probe)

2 µl 5× RNA-Elektrophoresepuffer

3,5 µl Formaldehyd

10 µl Formamid

0,1 µl Ethidiumbromid (Konz=1/10.000)

0,5 µl RNA-Beladungsfarbstoff

10 ×DNA- Beladungsfarbstoff (100 ml Ansatz):

30 ml Glycerin

50 ml 10 × TBE

Bromphenolblau (Spatelspitze)

Ethidiumbromid (Konz=1/10.000)

Agarose- Gelelektrophorese***0,8%iges Agarosegel (100 ml)***

0,8 g Agarose

100 ml 1× TBE-Puffer

5µl Ethidiumbromid

2%-iges Agarosegel (100 ml Ansatz):

2 g Agarose

100 ml 1 × TBE-Puffer

10 µl Ethidiumbromid

PAA-Gelelektrophorese***5%-iges Polyacrylamidgel***

85 ml 8,8 M Harnstofflösung

12,5 ml Acrylamid/Bisacrylamid (19:1), 40%-ig

60 µl TEMED

260 µl, 10%-ig APS

2,5 ml H₂O bidest***Loading Dye***

500 ml Formamid

150 mg Bromphenolblau

150 mg Xylencyanol

10 ml 0,5 M EDTA

Klonierung***LB_{Amp}- Agarplatten***

10 g/l Pepton

10 g/l Natriumchlorid

5 g/l Hefeextrakt

100 g/l Ampicillin Stammlösung

15 g/l Agar

0,05 mM IPTG-Stammlösung

80 mg/l X-Gal Stammlösung

Lösungsmittel: DMF

Tabelle A1: Auflistung der für die Validierung abgeleiteten Marker genutzten Sorten (Z: Zeiligkeit).

Sorte	Abstammung	Züchter	Zulassungsjahr	Z
Alexis	Br.1622 x Trumpf	Breun	1986	2
Annabell	90014 DH x Krona	Nordsaat/Ackermann	1999	2
Aphrodite	Villa x Plenum	Hege	1987	2
Aramir	Volla x Emir	Cebeco	1972	2
Aura	((Wisa x Carlsberg) x Stamm) x Villa	Breun	1975	2
Baronesse	((343/6 x 34/6) x J-427) x (Oriol x 6153 P40)	Nordsaat	1989	2
Belana	Aspen x Annabell	Nordsaat	2004	2
Bellevue	Ricarda x Extract	Limagrain/Nickerson	2003	2
Bido	Ceresia x Donaria	Ackermann	1960	2
Caminant	Ant 28-484(Grit) x Blenheim	Carlsberg	1997	2
Carafe	(Linden x Cooper) x Extract	Cebeco	2004	2
Carina	(Union x W 16 WV) x Volla	Ackermann	1971	2
Charlotte	CSBA 56-2-1276 x Chariot	Carsten	1998	2
Cheri	Trumpf x (Medusa x Diamant)	BPZ/Schweiger	1987	2
Extract	(Cask x Chariot) x Amber	NFC	1997	2
Gimpel	Proctor x Carlsberg II x Heine 4808 x Stamm	Lochow	1979	2
Golf	(Armelle x Lud) x Luke	Nickerson	1982	2
Halla	Sultan x St.434/62) x (Voldagsen x Carlsberg x Volla)	Ackermann	1995	2
Katharina	(HVS 1129/79 x 1057/81) x Dera	NRPB	1990	2
Korinna	26815/78 (62397/73 x 64045/74) x Dorina	Hadmersleben	1988	2
Krona	Nebi x Trumpf x Union x Gimpel	Hadmersleben	1990	2
Lenka	5013/74 x Q.496/72	Hadmersleben/Firlbeck	1985	2
Madras	(R. 62761 x 4.2606) x Alexis	Lochow	1997	2
Margret	Viskosa x Scarlett	Streng	2003	2
Marina	HVS 2.1142-4-79 x Salome)	Bernburg	1990	2
Marnie	Hanna x (Prisma x Br. 4714a)	Breun	2003	2
Minna	Trumpf x Carina) x Br.2357 b33 (Zita x Br.853 b12)	Breun	1992	2
Morex	Cree x Bonanza	MinAES (USA)	1978	6
Pasadena	Marina x Krona	Lochow	1998	2
Polygena	46401-80 x 45465-78	Hadmersleben	1994	2
Prestige	Cork x Chariot	Eger	1999	2
Ria	Hadm 55648-85 x Hadm 96677-87	Hadmersleben	1998	2
Scarlett	(Amazone x Br.2730e) x Kym	Breun	1995	2
Steffi	(Stamm 101 x Aramir) x Stamm 210	Ackermann	1989	2
Steina	Sultan x St.434/62) x (Voldagsen x Carlsberg x Volla)	Breun	1980	2
Trumpf	Diamant x 14029/64/6 ((Alsa x S3170/Abyss) x 11719/59) x Union	Hadmersleben	1973	2
Union	(Weihenst.MR II x Donaria) x Firl. 621	Firlbeck	1955	2
Ursa	(Thuringia x Hanna) x Annabell	Nordsaat	2001	2
Volla	Wisa x Haisa I	Breun	1957	2
Wisa	(Weihenst.MR I x Breun IN 2511) x Isaria	Breun	1951	2

Tabelle A2: Korrelationen der Umwelten für die einzelnen Malzqualitätsparameter.

Umwelten	FS94	FS95	FS96	IRL96	PEI96	HO96	FS05	FS06
VZ45°C								
FS94	1							
FS95	0,52**	1						
FS96	0,50**	0,73**	1					
IRL96	0,56**	0,69**	0,78**	1				
PEI96	0,46**	0,57**	0,76**	0,69**	1			
HO96	0,49**	0,72**	0,75**	0,70**	0,70**	1		
FS05	0,56**	0,48**	0,49**	0,59**	0,45**	0,43**	1	
Rohprotein								
FS94	1							
FS95	0,30*	1						
FS96	0,24	0,21*	1					
IRL96	0,31*	0,31**	0,17	1				
PEI96	0,35**	0,33**	0,06	0,58**	1			
HO96	0,45**	0,29**	0,20*	0,53**	0,62**	1		
FS05	0,28*	0,33**	0,02	0,41**	0,22*	0,17	1	
FS06	0,45**	0,19*	0,27**	0,30**	0,05	0,18*	0,22**	1
Gehalt an löslichem Stickstoff								
FS94	1							
FS95	0,34*	1						
FS96	0,45**	0,50**	1					
IRL96	0,36**	0,43**	0,68**	1				
PEI96	0,41**	0,35**	0,51**	0,65**	1			
HO96	0,32*	0,34**	0,49**	0,53**	0,50**	1		
FS05	0,48**	0,32**	0,47**	0,41**	0,28**	0,32**	1	
FS06	0,46**	0,35**	0,45**	0,39**	0,33**	0,34**	0,51**	1
Eiweißlösungsrad								
FS94	1							
FS95	0,46**	1						
FS96	0,49**	0,49**	1					

Fortsetzung Tabelle A2

IRL96	0,38**	0,53**	0,64**	1				
PEI96	0,38**	0,34**	0,56**	0,46**	1			
HO96	0,45**	0,36**	0,52**	0,44**	0,42**	1		
FS05	0,42**	0,53**	0,38**	0,51**	0,28**	0,28**	1	
FS06	0,62**	0,49**	0,47**	0,46**	0,42**	0,42**	0,49**	1

Friabilimeter

FS94	1							
FS95	0,47**	1						
FS96	0,48**	0,32**	1					
IRL96	0,39**	0,13	0,20**	1				
PEI96	0,13	0,25**	0,12	0,45**	1			
HO96	0,38**	0,22*	0,39**	0,59**	0,50**	1		
FS05	0,49**	0,15	0,22*	0,36**	0,12	0,23**	1	
FS06	0,42**	0,33**	0,42**	0,30**	0,21*	0,25**	0,27**	1

Brabender

FS94	1							
FS95	0,61**	1						
FS96	0,52**	0,45**	1					
IRL96	0,36**	0,37**	0,53**	1				
PEI96	0,11	0,35**	0,26**	0,51**	1			
HO96	0,42**	0,37**	0,41**	0,59**	0,53**	1		
FS05	0,18	0,03	0,10	0,06	0,07	0,09	1	
FS06	0,48**	0,43**	0,57**	0,60**	0,29**	0,37**	0,16	1

Viskosität

FS94	1						
FS95	0,52**	1					
FS96	0,39**	0,32**	1				
IRL96	0,35**	0,31**	0,02	1			
PEI96	0,39**	0,29**	0,30**	0,23**	1		
HO96	0,47**	0,45**	0,10	0,51**	0,31**	1	
FS05	0,43**	0,32**	0,06	0,18*	0,29**	0,23**	1

Fortsetzung Tabelle A2

FS06	0,39**	0,28**	0,07	0,28**	0,22*	0,30**	0,25**	1
Extraktgehalt								
FS94	1							
FS95	0,54**	1						
FS96	0,09	0,59**	1					
IRL96	0,41**	0,63**	0,64**	1				
PEI96	0,35**	0,42**	0,44**	0,56**	1			
HO96	0,47**	0,36**	0,35**	0,47**	0,63**	1		
FS05	0,38**	0,51**	0,46**	0,54**	0,43**	0,36**	1	
FS06	0,48**	0,49**	0,47**	0,61**	0,36**	0,33**	0,55**	1
Endvergärungsgrad								
FS94	1							
FS95	0,26	1						
FS96	0,22	0,35**	1					
IRL96	0,17	0,25**	0,18*	1				
PEI96	0,40**	0,24*	0,27**	0,13	1			
HO96	0,33**	0,27**	0,09	0,08	0,20*	1		
FS05	0,02	0,39**	0,19*	0,16	0,06	0,20*	1	
FS06	0,32*	0,53**	0,36**	0,25**	0,26**	0,34**	0,27**	1
MQI								
FS94	1							
FS95	0,58**	1						
FS96	0,27*	0,57**	1					
IRL96	0,49**	0,49**	0,51**	1				
PEI96	0,34*	0,49**	0,47**	0,58**	1			
HO96	0,48**	0,49**	0,35**	0,48**	0,62**	1		
FS05	0,35**	0,41**	0,36**	0,47**	0,32**	0,31**	1	
FS06	0,58**	0,49**	0,53**	0,56**	0,36**	0,32**	0,44**	1

* und ** Signifikant bei $p \leq 0,05$ bzw. $p \leq 0,01$. (Abkürzungen der Umwelten: FS94: Freising 1994; FS95: Freising 1995; FS96: Freising 1996, IRL96: Irlbach 1996; PEI96: Peine 1996; HO96: Hohenheim 1996; FS05: Freising 2005; FS06: Freising 2006).

Tabelle A3: Korrelationen zwischen den Malzqualitätsparametern und den agronomischen Merkmalen. Die Daten basieren auf den Mittelwerten über die Umwelten. Abkürzungen siehe Tabellen 13 und 17.

	VZ	RP	LN	ELG	VIS	BRA	FRI	EX	EV	MQI	AA
WH	-0,04	0,48**	0,34**	0,07	0,26**	0,10	-0,31**	0,35**	-0,35**	-0,05	-0,10
AES	0,00	-0,58**	-0,36**	-0,03	-0,15	-0,07	0,30**	-0,19*	0,25**	0,09	-0,10
LA	0,08	0,53**	0,42**	0,13	0,10	0,11	-0,30**	0,16	-0,22*	-0,09	0,08

* und ** Signifikant bei $p \leq 0,05$ bzw. $p \leq 0,01$.

Tabelle A4: Nukleotidsequenzen von Genfragmenten/ Markern, aus dem cDNA-AFLP, die QTLs für die Malzqualität flankieren.

cP64M47_325

tgcaggaccctggtctactattttcaaggaactgatttcagcagacacagcatcgcaccacttctctgttctggcgttgaatcatcatcatcg
gagccggattcgtgttcttcagcattctcatcaatgaactttctatctcaacttgccttttttggtgaagccactggcagctagtctttgtccaa
ggcaccagaagacttttgaatggacagaaggacggcctgccactgtcatcatcatcagttccgaaccatctgtccacctttctgttaag
attgaaccttttgta

cP66M47_328

tgcaggatctgctgagcagtgagctggacgatcttggaaagagatggcgtagatgctggcttcgggtgattgggtggaaacagccaa
gcatgcagtggtcgcgggaggttgcattcagattccaggctcctgcgaagatggtaacctttctcgcctctgagaactcggatgctct
cgcgtccaacgcagcttgtatagtgctgtaacagggtcaatcagaaaactggctttgaccagcaagcagccccagtagcatatccacg
ctcgcctgcttggcgcctcaag ttgta

cP75M48_406

tgcaggtacaccttacacatacaggaacgagaaccagtttctgcacttcaactccatcaggatccctatgccgagtacgatttctggataa
atacgggtgggggtgacggattattcacagatttctgctggaagcgtacaccagtaccaagaactgaaaacccacacccgaaggacgca
accgcgagcagcctcactactaaaaattgctcagatgatcgcagcatacgaaggccgctgaataagttgtgtccagcaaatgactgcat
tttcagtgatcaatgcgcaagacaaaatgggtcgcatttgatgatccgcagtgacctgaaaggtcactaatagatgttggtttacgctgtt
atatagtttac

cP71M51_388

tgcagggaaggcgtggtgccagaccatgatttctgacagcgactacaccgagttcgcagcttctccaagtggctcggcgtcagccagtg
atcatctgttgaagtagtagcagttttatcgtcctaccttgagaccctaaagcctttgagaccctaaagtagattttgtcattgtcgtgttat
ggagtctgagacatcgaatgctgttttgtagctggttatctcagtggtttatctgtggatgccttttgcagacatgttctgtggcatactttatc
gtccgggtgctagttcagattctgagtcctgttttcatatactcttatgaatgcgaaataatttcgtcatgg tta

cP77M50_358

tgcaggccgaggaataaacgcgcggccccaaggctcttgacctcctccaacaacttgtgctcaaagtcactctgaaaactttcaaagtttg
atccacattgcgaacgagcaacagatccccagcagactccacaagataagaaggcattacgctgtcatcatctcctctttatataca
tcatcatctcctctgtgtatatacgtccacatccggtggcgacatctcgggtatgacatgagctcacatcatcacactggtctgctgctg
gtgcgaccaactgagtagacatccacgcgcatcagcacaatagacgtcgccttggaggtta

cP67M55_570

tgcaggcaagaccacaacatgcattactactctggtggttcagggtccaggggccttaccactttaccagccaggagcccttctagc
agcctcatttcgctgctcctgtaactccgaggaccggccttctcgcctatccctgagcaaatgtttctactgctgctcactggaa
aacgtctaggtctgcctgtgacacgccatattcaatcgttcacccataccgagcaagaggtccctactgcacactggaagcattccaggt
ctgcctgtgacactccgtattccaggacatcggcgtcaaacatctcgggcttgattcagctgccacaagaaactcctgtagacagcaac
ttctccggccggcggcgtctgctcagttctacctggaccaggcttaaatggtggcaggctcagcgtctcgagggacaagcaacaagat
gttgatgaggtcgaagcatacagggcacgtgttgggttcagtcagatgagatggttacgagcactcagcgttacgcagaagcaccggt
gccgcgctcgtatgattcagcatatccccattcgtta

cP68M48_485

tgcaggcccaaatgctgaaagcgccttccagactgtcttgcagagatcttcaagatccacagcgagaagaacatagtgaccgacccaa
aggccaatggtgctgcgccgctggtggcggcaagaaggttctgtcccaggccagcagagatcccgaagagcaagtgtcgcg
gttctatgtaatttctgctacaaaatgttggattgtgtgttttgagaatattcaggtgtctggctatagatccccactgagctttaggtttca

agtattggttcatttagtgagacggatggggtcggtggcagagcaagatgactcatctccaccgactacgaagttaggga
gtgagcagatgaactccatttcataggtccgagctgtgtgattgattcaattgacgtgtatgatgactcaggacaccgcaaagcctctatg
tagtgta

cP70M48_294

tgcaggctgattgagatccaattgatggccctgagaatctgaccataacagagtaaccgctgaaccgtgccaatcaaccaatcaatcaat
caaaataaccatgaacagaaatcaaactcaactccgcccttctaaataacctaccatcactcagaactaccgctcgccattgcttggtgta
tccaagatgagagcacacataccaaaagcgggatcagctggtgaagcagtaagaatccacgagggcctcaaagaatcgacctggtgta

cP72M59_571

tgcaggccagctcaagaacctcaaggcggagcttccctcctccgcgtcgccaaggtcaccggcggagccccaacaagctctccaa
gatcaaggtggtgcacatctgattgcgagggtgctcacggatctcacagaagcagaaggtggcgtgagggagcgtacaagaac
aagaagcttctaccgctcgacctccgccaagaagaccgcgccatccgagcgtctaccaagcatcagctctattgaagaccaa
gagggagaagaagcgtgagaagtactccccatgaggaagtatgctatcaaggcctaggtattaggagcacatgtttaccggccgagtt
ttgccagaagttgcatgaattttatgtttgtgactcccctgctatctaagtacaatgtatcagatcctgcttgaattcgaactttgcttat
tgacactatgttctggtatagctgcttgggtggtgcagtatgattgtactttgtagttccagtacatctgattgtggaagtagatgct
tgttgatgtgcagtgatggttatggtgctggttcgagttccatctgattgtggaagtaagccatttagtgttcatcgttgctggatgctttatgtt
cttcattagtttctgatagtggttctaggtagta

cP76M52_228

tgcaggtaagcatacagacagagccaagatgggaaacaaaggataaccagtaacccttactcactcatcaaaagctctacaactatcact
acagctggtgaatgtgaattcgagcttcttcagcaatgagctcccaagtggg

cP78M55_201

tgcagggttctctgcattttttggttctctgtagaacgtccgaaggattactaatagaagcctcgggtgtttttatttcacaagcttgttgcta
gcctagctggttagccgatccgcgctggacatgtggtctctggttcgaatccagccgcgccatgcctagtttcgta

cP63M62_259

tgcaggaaggcaagatcttccaaagaacttgcaaaagcattgtcagtgatgaacctacatcgaaactaacactaaggagcatcgatatt
tcacagtcagagttcttcccttccacgtgcgactatattcagcagaagatctctgaatgctctatggtcacttccaacgtcgatactgat
gacatgaagttgctgcggcgcattacgggtcaaggttctgaagta

cP67M62_270

tgcaggcaacagcaacgggacgatcatcggaactccagcagcagaacatgcacatcgtctacgacctggagagcaacaagatggtct
tcacgcctgcgcttgcgacaagctgtaactgtactgtgtactgttagggacaacgaacagcctgtttctgctcctagtactaaataaag
aacgtgcattgattgftaaaatcattgccggctgactttgagcggaccgttctgctggcaagta

cP77M50_150

tgcagggtgataagattagcatgtgtgctggtggagtgatctgatgctggttaggaagatcccttgccttgcctacgggtgatgttctagt
gcagtgcttgatgta

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Wenzel für die Überlassung des Themas an der Technischen Universität München, Herrn Prof. Dr. Back für die Übernahme des Koreferats sowie Frau Prof. Dr. Schön für den Vorsitz der Prüfungskommission herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Markus Herz für die umfassende Unterstützung bei der Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit, für zahlreiche Anregungen und Diskussionen sowie für die geduldige Durchsicht des Manuskriptes.

Ein ganz herzlichen Dank geht auch an Dr. Günther Schweizer für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und seine große Unterstützung in fachlichen, organisatorischen und allen sonstigen Fragen.

Herzlich danke ich weiterhin Dr. Sabine Mikolajewski. Ihre Ideen und Tipps gerade zu Beginn meiner Arbeit und ihre stete Diskussionsbereitschaft und Beratung waren mir eine große Hilfe. Auch für die Unterstützung und Einführung in die RNA- und cDNA-Methoden danke ich ihr sehr.

Ebenso geht ein ganz großer Dank an Dr. Jennifer Häberle, mit der ich in Fragen der statistischen Auswertungen und QTL-Analysen diskutieren konnte und von der ich Anregungen und Hilfe in jeder Hinsicht bekommen habe.

Für die ausgezeichnete technische Assistenz bei den molekularen Arbeiten möchte ich mich insbesondere bei Alexandra Jestadt und Susanne Wüllner ganz herzlich bedanken. Meinen Bürokolleginnen Manuela Diethelm und Rebecca Seidenberger möchte ich für angeregte und anregende Diskussionen und ihre Hilfsbereitschaft in jeder Hinsicht danken.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Gerste ganz herzlich für die Durchführung und Organisation der Feldversuche, sowie der Abteilung Qualitätssicherung und Untersuchungswesen 4 der LFL für die Durchführungen der vielen Kleinmälzungen und Malzqualitätsanalysen.

Für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die Hilfsbereitschaft und viele interessante und lustige Gespräche möchte ich mich außerdem bei den weiteren Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Genomanalyse bzw. der Genomanalyse Hopfen, bei Alfred Barth,

Christoph Bauer, Petra Greim, Petra Haager, Josef Holzapfel, Luise Logothetis, Elena Magde-Pimentel, Veronika Maier, Sabrina Petosic und Dr. Stefan Seefelder bedanken.

Ein Dank geht auch an Dr. Michael Schmolke für das kritische Lesen dieser Arbeit sowie seine zahlreichen Anregungen.

Für die Bereitschaft einen Teil der Feldversuche zu übernehmen, danke ich schließlich den GABI-MALT Partnern Lochow-Petkus und der Saatenunion.

Diese Arbeit wurde durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) im Rahmen des GABI-MALT Projektes finanziert.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Kerstin Krumnacker

Geburtsdatum: 14. Juni 1980

Geburtsort: Datteln, Deutschland

Familienstand: ledig

Schulbildung

1986-1990: Besuch der Grundschule in Waltrop

1990-1999: Besuch des Theodor-Heuss-Gymnasiums in Waltrop

Studium

1999-2004: Studium der Agrarbiologie an der Universität Hohenheim

Studienpraxis

Juli - Oktober 1999: Milchvieh- und Ackerbaubetrieb in Hardheim/ Odenwald

August - September 2000: Besamungsstation Neustadt/Aisch

August - September 2002: Pflanzenzuchtunternehmen Strube-Dieckmann/ Nienstädt

Oktober - Januar 2004: Praktischer Teil der Diplomarbeit im Pflanzenzuchtunternehmen Norddeutsche Pflanzenzucht/ Hohenlieth

Juli - September 2004: Plant Research International B.V., Wageningen/ Niederlande

Berufserfahrung

Dezember 2004-Dezember 2007: Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Rahmen des GABI-MALT Projektes am Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft/ Freising

