

**Aus dem Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel**

**Physikalische Kartierung der Region des
Schossgens der Zuckerrübe
(*Beta vulgaris* L.)**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Vorgelegt von
Dipl. Biochem. Gunnar Jacobs
aus Niebüll

Kiel 2001

Dekan: Prof. Dr. Th. Bauer
Referent: Prof. Dr. C. Jung
Koreferent: Prof. Dr. J. Soll
Tag der mündlichen Prüfung: 20. Juni 2001

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Zuckerrübe	1
1.2	Pflanzliche Genomanalyse	3
1.2.1	Molekulare Markersysteme	4
1.2.2	Entwicklung genetischer Karten	6
1.2.3	Einsatz von physikalischen Karten	7
1.2.4	Karten-gestützte Genklonierung	8
1.2.5	<i>Large insert libraries</i>	9
1.2.5.1	YAC-Vektoren	9
1.2.5.2	BAC-Vektoren	10
1.2.5.3	Vergleich von YAC- und BAC-Vektoren	12
1.3	Das Schossgen der Zuckerrübe	13
1.4	<i>Arabidopsis thaliana</i> als Modellpflanze	14
1.5	Ziele der Arbeit	15
2	MATERIAL UND METHODEN	16
2.1	Chemikalien und Enzyme	16
2.2	DNA-Längen- und Größenstandards	19
2.3	Biologisches Material/Organismen	19
2.3.1	Bakterienstämme, Vektoren und DNA-Sonden	19
2.3.2	Pflanzenmaterial	22
2.4	DNA-Isolierung	23
2.4.1	Genomische DNA aus Pflanzen	23
2.4.2	Plasmid-DNA	23
2.4.2.1	DNA-Präparation mit dem QIAfilter Plasmid Maxi/Midi Kit	23

2.4.2.2	Minipräparation von Plasmid-DNA mit GFX™ Micro Plasmid Prep Kit	24
2.4.2.3	Schnellmethode zur Erfolgskontrolle nach Transformation	24
2.5	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	24
2.6	Die <i>amplified fragment length polymorphism</i>-Technik (AFLP)	25
2.6.1	Restriktion/Ligation	25
2.6.2	Präamplifikation	26
2.6.3	Amplifikation	27
2.6.4	Analyse und Detektion der Amplifikate	28
2.7	Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)	29
2.8	SOUTHERN-Analyse	29
2.8.1	SOUTHERN-Transfer	30
2.8.1.1	Transfer der DNA	30
2.8.1.1.1	Transfer mittels Kapillarkraft	30
2.8.1.1.2	Vakuumtransfer	30
2.8.1.2	Fixierung der DNA	30
2.8.2	Radioaktive Hybridisierung mit ³² P	31
2.8.3	Nicht-radioaktive Hybridisierung mit GENEIMAGE®	32
2.9	Sequenzierung	32
2.10	Sequenz-Homologie-Vergleiche	33
2.11	Arbeiten mit der YAC-Bank	33
2.11.1	Anzucht von YAC-Klonen (fest/flüssig)	33
2.11.1.1	Anzucht auf Festmedium	36
2.11.1.2	Anzucht in Flüssigmedium	35
2.11.2	Isolierung genomischer Hefe-DNA	35
2.11.3	Sichten der YAC-Bank	36
2.11.3.1	Sichten der YAC-Bank mittels AFLP	37
2.11.4	AFLP- <i>fingerprinting</i> von YACs	38
2.11.5	Isolierung von YAC-Endklonen	38

2.11.6	<i>Chromosome walking</i>	40
2.11.7	<i>Contig-Analyse</i>	41
2.11.8	Isolierung von hochmolekularer genomischer DNA aus YAC-Klonen	41
2.12	BAC-Klonierung	42
2.12.1	Isolierung hochmolekularer DNA aus Pflanzen	43
2.12.2	Präelektrophorese	45
2.12.3	Partialrestriktion mit <i>HindIII</i>	45
2.12.3.1	Optimierung der Partialrestriktion	46
2.12.3.2	Präparative Partialrestriktion	46
2.12.4	Größenselektion	47
2.12.5	Vektorpräparation	48
2.12.5.1	Plasmid-DNA-Isolation	48
2.12.5.2	<i>Plasmid-safe</i> TM -DNase-Behandlung	48
2.12.5.3	Restriktion mit <i>HindIII</i>	48
2.12.5.4	Dephosphorylierung	49
2.12.5.5	Aufreinigung des präparierten Vektors	49
2.12.5.6	Qualität der Vektorpräparation	49
2.12.6	Ligation	50
2.12.7	Entsalzen der Ligationen	50
2.12.8	Transformation	50
2.12.9	Analyse der Klone	51
2.12.9.1	Mini-DNA-Isolation	51
2.12.9.2	Insertionsgrößenbestimmung durch <i>NotI</i> -Restriktion	52
2.13	Picken und Lagern der BAC-Klone	53
2.14	Herstellung von und Hybridisierung auf <i>high density</i>-Filter	53
2.15	Charakterisierung der BAC-Bank	54
3	ERGEBNISSE	56
3.1	Sichten der YAC-Bank	56

3.1.1	Sichten der YAC-Bank mit AFLP-Markern	56
3.1.2	<i>Chromosome walking</i>	61
3.1.3	Bestimmung der YAC-Insertionsgrößen	64
3.1.4	Isolierung von YAC-Enden	67
3.1.5	Lokalisation der YAC-Enden	68
3.1.6	Entwicklung von PCR-Markern aus YAC-Enden	70
3.2	Erstellung einer physikalischen Karte	73
3.3	Genetische und physikalische Karte der Region des Schossgens	78
3.4	Untersuchungen mit <i>A. thaliana</i>-Gensonden	80
3.5	Erstellung einer Zuckerrüben-BAC-Bank	81
3.5.1	Charakterisierung der BAC-Bank	84
4	DISKUSSION	88
4.1	Sichten der YAC-Bank	88
4.2	Analyse der isolierten YAC-Klone	90
4.3	Entwicklung von STS-Markern	93
4.4	Erstellung einer physikalischen Karte	94
4.5	Konstruktion einer Zuckerrüben-BAC-Bank	98
4.6	Kontrolle des Blühens bei anderen Pflanzen	107
4.7	Ausblick	109
5	ZUSAMMENFASSUNG	110
6	SUMMARY	112
7	LITERATURVERZEICHNIS	114

8	ANHANG	129
8.1	Klonierte YAC-Endklone einschließlich der <i>consensus</i>-Sequenzlänge.	129
8.2	<i>consensus</i>-Sequenzen der YAC-Enden.	131
8.3	Sequenzen verwendeter Primer.	142
8.4	Homologie-Ergebnisse der YAC-End-Sequenzen	145
8.5	STS-Marker Y29B6R	177
8.6	STS-Marker Y73G8L	178
8.7	STS-Marker Y89F10L	179

Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen

Tabelle 1.1.1	Arten der Gattung <i>Beta</i>	2
Tabelle 2.1.1	Verwendete Chemikalien	16
Tabelle 2.1.2	Verwendete Enzyme	18
Tabelle 2.2.1	Verwendete DNA-Standards	19
Tabelle 2.3.1.1	Von YAC-Enden abgeleitete DNA-Sonden	21
Tabelle 2.6.1.1	Sequenzen der AFLP-Adapter	26
Tabelle 2.6.2.1	PCR-Programm für die Präamplifikation	27
Tabelle 2.6.3.1	<i>touch down</i> -PCR-Programm für die Amplifikation	28
Tabelle 2.8.2.1	Zusammensetzung einer Doppelmarkierung	31
Tabelle 2.11.3.1.1	PCR für das Sichten der YAC-Bank mit AFLP-Primern	37
Tabelle 2.11.5.1	Verwendete YAC-Arm spezifische Primer	39
Tabelle 2.11.5.2	Programm für die inverse PCR	40
Tabelle 2.15.1	Sonden für die Charakterisierung der BAC-Bank	55
Tabelle 3.1.1.1	Zum Sichten verwendete AFLP-Primerkombinationen	57
Tabelle 3.1.1.2	Mit AFLP identifizierte YACs	59
Tabelle 3.1.1.3	Zusammenfassung der Ergebnisse des AFLP-Sichtens der YAC-Bank	59
Tabelle 3.1.2.1	Für das <i>chromosome walking</i> eingesetzte YAC-Enden	62
Tabelle 3.1.2.2	Ergebnisse der <i>chromosome walking</i> -Experimente	63
Tabelle 3.1.2.3	Übersicht über die Ergebnisse der drei „Sichtungsebenen“ der <i>chromosome walking</i> -Experimente	64
Tabelle 3.1.3.1	Zusammenfassende Darstellung aller isolierten YACs	65
Tabelle 3.1.4.1	Auszug aus den Ergebnissen der Homologie-Vergleiche der YAC-Endsequenzen	67
Tabelle 3.1.5.1	Lokalisierte YAC-Enden	69

Tabelle 3.2.1	Zusammenfassung der mittels <i>chromosome walking</i> detektierten Überlappungen	74
Tabelle 3.2.2	Übersicht über die Ergebnisse des AFLP- <i>fingerprintings</i>	77
Tabelle 3.5.1.1	Charakterisierung der BAC-Bank	87
Abbildung 2.11.5.1	Schematische Darstellung von pYAC4	39
Abbildung 2.12.1	Übersicht über die Schritte zur BAC-Klonierung	43
Abbildung 2.14.1	4x4 <i>double offset</i> -Muster	54
Abbildung 3.1.1.1	AFLP-Karte der Region des Schossgens	58
Abbildung 3.1.1.2	Identifikation des YACs Y67G1 mittels AFLP-Technik	60
Abbildung 3.1.3.1	Pulsfeldgel zur Bestimmung der YAC-Insertionsgrößen	65
Abbildung 3.1.5.1	Nicht-radioaktive Hybridisierung mit Y102H12R auf Zuckerrüben-DNA	70
Abbildung 3.1.6.1	PCR-Test des Markers Y29B6R	71
Abbildung 3.1.6.2	PCR-Test für den Marker Y89F10L	72
Abbildung 3.1.6.3	PCR-Markertest für Locus Y102H12R	73
Abbildung 3.2.1	PCR-Beispiele des <i>chromosome walkings</i>	75
Abbildung 3.2.2	Beispiele des AFLP- <i>fingerprintings</i>	76
Abbildung 3.2.3	Darstellung der drei erstellten <i>contigs</i>	78
Abbildung 3.3.1	Vergleich der genetischen und physikalischen Karten der Region des Schossgens	79
Abbildung 3.4.1	Hybridisierung mit FCA- γ	80
Abbildung 3.4.2	Hybridisierung mit FRI-C	81
Abbildung 3.5.1	Überblick über die Zwischenschritte der BAC-Klonierung	83
Abbildung 3.5.1.1	Insertionsgrößenbestimmung von BACs	85
Abbildung 3.5.1.2	Größenverteilung der BACs	86

Abkürzungen

A	Adenin
AFLP	<i>amplified fragment length polymorphism</i>
BAC	künstliches Bakterien-Chromosom (<i>bacterial artificial chromosome</i>)
bp	Basenpaar
C	Cytosin
cfu	<i>colony forming unit</i>
CHEF	<i>contour-clamped homogenous electric field</i>
Ci	Curie
cM	Centi-Morgan
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EST	<i>expressed sequence tag</i>
g (x g)	Erdbeschleunigung (Vielfaches der Erdbeschleunigung)
G	Guanin
h	Stunde
HMW-DNA	<i>high molecular weight DNA</i>
IPTG	1-Isopropyl- β -D-1-Thiogalactopyranosid
kb	Kiobasenpaar
M	molar

Mb	Megabasenpaar
Min.	Minute
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pers.	persönliche (Mitteilung)
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
pH	negativ dekalischer Logarithmus der H ⁺ -Konzentration
Sek.	Sekunde
T	Thymin
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
<i>unit</i>	Maß für die katalytische Aktivität bei Enzymen
UV	Ultraviolett
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro- 3-Indoxyl-β-D-Galactopyranosid
YAC	künstliches Hefe-Chromosom (<i>yeast artificial chromosome</i>)
λ	Bakteriophage Lambda

1 Einleitung

1.1 Zuckerrübe

Die Zuckerrübe (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris* HELM var. *altissima* DÖLL) gehört zur Familie der Gänsefußgewächse (*Chenopodiaceae*). Die halophilen, oft windbestäubten *Chenopodiaceae* sind in Salzwüsten, entlang der Meeresküsten und als Ruderalpflanzen verbreitet. Wildformen werden in China, Asien (Zentral-, Westasien), entlang der Küsten des Mittelmeeres und der europäischen Küsten am Atlantischen Ozean gefunden. Die Gattung *Beta* wird in vier Sektionen unterteilt (Tabelle 1.1.1). Von der mediterranen Strandpflanze *Beta vulgaris* ssp. *maritima* (L.) THELL. stammen die Kulturformen der Runkelrübe ab, zu denen auch die Zuckerrübe gehört.

Ausgewählte Formen von *Beta vulgaris* ssp. *maritima* wurden bereits von den Assyern kultiviert (MABBERLEY, 1997). Ihre Abkömmlinge werden heute in der Unterart *vulgaris* zusammengefasst. Im Jahre 1747 wies A. S. MARKGRAF (Berlin) nach, dass der zu 1,6–3 % in Runkelrüben enthaltene Zucker mit dem Rohrzucker identisch ist. Die Ausgangsform der heutigen Zuckerrüben, die „Weiße Schlesische Rübe“, entstand Ende des 18. Jahrhunderts aus einer Kreuzung von Mangold und Futterrübe (SCHMIDT, 1998). Im Jahre 1802 gründete F. G. ARCHARD die erste Rübenzuckerfabrik in Cunern (Schlesien). Heute wird eine Zuckerausbeute von rund 16 % des Frischgewichts erreicht. Ungefähr 38 % der Weltzuckerproduktion wird durch Zuckerrübenanbau bestritten (FRANKE, 1997).

Charakteristisch für die Kulturformen von *Beta* ist ein zweijähriger (biennellen) Lebenszyklus, bei dem im Falle der Zuckerrübe im ersten Jahr eine fleischige Wurzelrübe mit geringem Hypokotylanteil gebildet wird. Nach einer Periode von moderaten Temperaturen (4-7°C, Vernalisation) treibt unter Langtagbedingungen im zweiten Jahr ein rispig verzweigter Blütenstand aus. Die Periodendauer bei dieser photothermalen Induktion ist genetisch determiniert (BOSEMARK, 1993). Bei entsprechender Veranlagung kann eine kurze Kälteperiode nach der Aussaat bereits im ersten Jahr zur Bildung von Blütenständen führen. Dieser in der Landwirtschaft unerwünschte Vorgang wird als „Schossen“ bezeichnet. Die schossenden Zuckerrüben (Schosser) führen als sogenannte Unkrautrüben zu Einbußen beim Ertrag und erschweren die maschinelle Ernte.

Tabelle 1.1.1: Die Arten der Gattung *Beta*. 2n: Chromosomenanzahl im diploiden Zustand.
Entnommen aus SCHMIDT (1998).

Sektion	Art	Chromosomenzahl (2n)
Sektion I: <i>Beta</i>	<i>B. vulgaris</i> –	18
	ssp. <i>vulgaris</i>	18
	ssp. <i>maritima</i>	18
	ssp. <i>adanensis</i>	18
	<i>B. patula</i>	18
	<i>B. macrocarpa</i>	18, 36
Sektion II: <i>Corollinae</i>	<i>B. corolliflora</i>	36
	<i>B. macrorhiza</i>	18
	<i>B. lomatogona</i>	18
	<i>B. trigyna</i>	54
	<i>B. intermedia</i>	18
Sektion III: <i>Nanae</i>	<i>B. nana</i>	18
Sektion IV: <i>Procumbentes</i>	<i>B. patellaris</i>	18, 36
	<i>B. procumbens</i>	18
	<i>B. webbiana</i>	18

Die Zuckerrübe ist ein windbestäubender Fremdbefruchter. Der Pollen kann durch Wind über mehr als 5000 m verbreitet werden (SMITH, 1987). Viele mediterrane *Beta*-Wildformen sind einjährig (annuell), so z. B. auch *B. vulgaris* ssp. *maritima*, die als Ursprung der Einjährigkeit angesehen wird. Die Windbestäubung und die Einjährigkeit der verwandten Wildformen haben Konsequenzen für die Züchtung und die Saatgutvermehrung der Zuckerrübe. Zur Entwicklung neuer Sorten wird im Vergleich zu Arten mit einjährigem Vegetationszyklus ein längerer Zeitraum benötigt, da der Generationszyklus über zwei Jahre verläuft. Bei Kreuzungen und Saatgutvermehrungen muß verstärkt darauf geachtet werden, dass die Einjährigkeit durch Pollen von Wildrüben nicht eingekreuzt wird.

Die Einjährigkeit wird von dem dominanten Allel *B* des Schossgens (Gen *B*) kontrolliert (ABE *et al.*, 1997). Dieses Gen ist züchterisch von großem Interesse. Einerseits könnte es zur Beschleunigung von Rückkreuzungsprogrammen dienen (BOSEMARK, 1993), andererseits könnten spezifische Tests für das Gen *B* den Anteil von Schossern im Saatgut nachweisen. Dieser Faktor könnte als Qualitätsmerkmal im Saatguthandel dienen.

Beta vulgaris L. ist diploid und besitzt 18 Chromosomen ($2n = 2x = 18$). Der DNA-Gehalt pro Zellkern beträgt 1,57 pg, was einer haploiden Genomgröße von 758 Mb entspricht (ARUMUGANATHAN & EARLE, 1991). Das Genom von *B. vulgaris* ist im Vergleich zu anderen landwirtschaftlich genutzten Pflanzen klein.

In den letzten Jahren wurde die Zuckerrübe zunehmend zum Objekt aktueller molekularbiologischer Studien. So wurden z. B. verschiedene Kopplungskarten der Zuckerrübe (PILLEN *et al.*, 1992, 1993; BARZEN *et al.*, 1992, 1995; HALLDEN *et al.*, 1996; SCHONDELMAIER *et al.*, 1996; SCHUMACHER *et al.*, 1997) mit insgesamt über 900 Markern in neun Kopplungsgruppen erstellt. SCHONDELMAIER & JUNG (1997) ordneten diese Kopplungsgruppen mittels der trisomen Additionslinien von Butterfass den morphologisch kaum unterscheidbaren Zuckerrübenchromosomen zu.

Mit dem Gen *HsI^{pro-1}* wurde erstmals ein Nematodenresistenzgen aus einer Wildrüben-Translokationslinie kloniert (CAI *et al.*, 1997) und durch *in situ*-Hybridisierung chromosomal lokalisiert (SCHMIDT *et al.*, 1997). Im Jahr 1999 unternahmen Weber *et al.* einen Versuch, Kopplungskarten und *quantitative trait loci* (QTL) bei Zuckerrüben zu integrieren. DESPLANQUE *et al.* (1999) untersuchten mit Hilfe von RFLP- und Mikrosatellitenmarkern den Genfluss zwischen kultivierten Rüben und Wild- bzw. Unkrautrüben; HANSEN *et al.* (1999) evaluierten AFLP-Marker an *Beta*-Genomen für *fingerprinting*-Anwendungen.

1.2 Pflanzliche Genomanalyse

Seit über 1000 Jahren ist die mehr oder minder gezielte Auswahl von Saatgut eine der wichtigsten pflanzenbaulichen Maßnahmen. Aus der anfänglich eher unbewußten Selektion entwickelte sich schnell eine systematische Selektion von Kulturpflanzen mit für den Menschen günstigeren Eigenschaften. Die Bedeutung der Genetik in der Pflanzenzüchtung wurde ab 1900 erkannt. In der Züchtung wurden neue Entdeckungen auf dem Gebiet der

Genetik schnell aufgegriffen und eingesetzt. Kurze Zeit nach der Wiederentdeckung der Mendelschen Regeln durch CORRENS, DeVRIES und TSCHERMAK (STUBBE, 1965) wurden deren Grundregeln zum Basiswissen eines Züchters (BECKER, 1993).

Die Entdeckungen von A. T. MORGAN, dass die Gene in *Drosophila melanogaster* linear angeordnet sind und die Häufigkeit von Rekombinationen ein relatives Maß für die Abstände der Gene ist, führte zur Erstellung einer ersten genetischen Kopplungskarte von *D. melanogaster* durch STURTEVANT (1913). SAX (1923) entwickelte die Idee einer Marker-gestützten Selektion, wobei die Marker eine höhere Heritabilität als die zu kartierende Eigenschaft selbst aufweisen müssen (RYALS *et al.*, 1996). Die ersten genetischen Karten von Pflanzen entstanden in den dreißiger Jahren (MCARTHUR, 1934; EMERSON *et al.*, 1935).

Die Kopplungskarten basierten anfänglich nur auf morphologischen Markern. Auf Grund der geringen Zahl von verfügbaren morphologischen Markern waren die Karten sehr lückenhaft. Durch Integration von Isozymen als Marker in den siebziger Jahren wurden die Karten dichter (TANKSLEY & RICK, 1980). Eine Marker-gestützte Selektion war auf Grund der zu geringen Anzahl an Markern mit diesen Karten noch nicht möglich.

Erst in den siebziger Jahren nach der Entdeckung der rekombinanten DNA-Technologie war der Durchbruch in der Genomkartierung erreicht. Inzwischen wurden verschiedene Arten von molekularen Markersystemen entwickelt, die auf Unterschieden in der DNA, wie z. B. Deletionen, Insertionen, Duplikationen und Punktmutationen basieren.

1.2.1 Molekulare Markersysteme

Die wichtigsten molekularen Markersysteme, die seit der Entdeckung der rekombinanten DNA-Technologie entwickelt wurden, sollen im Folgenden kurz dargestellt werden.

Das RFLP-Markersystem:

Der Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (*restriction fragment length polymorphism*, RFLP) nutzt die von SOUTHERN (1975) entwickelte Technologie der SOUTHERN-Hybridisierung. Genomische DNA wird mit Restriktionsendonukleasen restringiert, gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und immobilisiert. Spezifische DNA-Fragmente werden als Sonden eingesetzt. Hybridisieren bei verschiedenen Individuen unter-

schiedlich große DNA-Fragmente mit der Sonde, so handelt es sich um einen RFLP (BOTSTEIN *et al.*, 1980). Der RFLP wird überwiegend codominant ausgewertet, verhält sich wie ein mendelndes Allel und ist gegenüber Umwelteinflüssen stabil. Da nahezu jedes DNA-Fragment als Sonde und jedes Restriktionsenzym verwendet werden kann, ist die Anzahl polymorpher Loci hoch.

Das RAPD-Markersystem:

Dieses System basiert auf der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) mit kurzen anonymen „Zufallsprimern“ (WILLIAMS *et al.*, 1990). Die von der genomischen DNA amplifizierte Fragmente werden gelelektrophoretisch aufgetrennt und analysiert. Da jede Fragmentgröße einen RAPD-Marker (*random amplified polymorphic DNA*) darstellt, können diese nur dominant ausgewertet werden. Die Anzahl an variablen Markerloci ist hoch, die Störanfälligkeit der Methode aber groß.

Das AFLP-Markersystem:

Die von VOS *et al.* (1995) beschriebene AFLP-Technik (*amplified fragment length polymorphism*) ist eine relativ neue Methode, mit der in kurzer Zeit viele polymorphe Marker erhalten werden. Im ersten Reaktionsschritt wird genomische DNA mit zwei Restriktionsenzymen restringiert. Nach Ligation von spezifischen Adaptoren an die Enden der Fragmente erfolgt eine Amplifikation (PCR) mit selektiven Primern. Die AFLP-Marker lassen sich nur zum Teil codominant auswerten (Intensität). Durch Verwendung von verschiedenen Restriktionsenzymen und verschiedenen Primersätzen lassen sich nahezu beliebig viele Marker entwickeln. Die Stabilität des AFLP-Systems ist hoch, erfordert aber eine teure Laborausstattung.

Das Mikrosatelliten-Markersystem:

Mikrosatelliten sind kurze, sich tandemartig wiederholende Motive in einem DNA-Abschnitt. Sie werden codominant vererbt und treten über das gesamte Genom verteilt auf (BECKER & HEUN, 1995). Die flankierenden, konservierten Sequenzen des repetitiven Bereichs dienen als Bindungsstellen für Primer. Die Entwicklung eines Mikrosatelliten-Markers ist relativ aufwendig und kostspielig, da die konservierten Regionen kloniert und sequenziert werden

müssen. Die Polymorphismen werden durch unterschiedlich lange PCR-Amplifikate sichtbar. Dies ist gleichbedeutend mit einer verschiedenen Anzahl von Motivwiederholungen (AKKAYA *et al.*, 1992; SANCHEZ *et al.*, 1996).

Das SNP-Markensystem:

Ein *single nucleotide polymorphism*-Marker (SNP, COLLINS *et al.*, 1997) basiert auf einem Unterschied von nur einer Base. Solche durch Punktmutationen entstandenen Unterschiede sind im Genom relativ häufig. Für jeden Markerlocus müssen die Unterschiede durch z. B. vergleichende Sequenzierung identifiziert werden. Die Stabilität der Marker in verschiedenen Populationen ist gering. Die Detektion von SNPs benötigt eine teure Laborausstattung, kann aber codominant erfolgen.

Jedes der molekularen Markersysteme hat Vor- und Nachteile. Die Wahl des geeigneten Markersystems hängt von der Aufgabenstellung ab. Eine Kombination von mehreren Markersystemen ist stets von Vorteil.

1.2.2 Entwicklung genetischer Karten

Genetische Kopplungskarten sind ein wertvolles Instrument genetischer Studien. Ein Erbgang zweier Gene, die nicht nach den Mendelschen Regeln, d.h. unabhängig von einander vererbt werden, war bereits vor der Einführung des Begriffs der Kopplungskarte bekannt. Dieses abweichende Verhalten wurde als Kopplung bezeichnet.

Die Anzahl von Rekombinationsereignissen zwischen diesen Genen wird als Distanzmaß verwendet. MORGAN (1910) definierte die Einheit der genetischen Distanz als Prozent der Rekombinanten, also des Anteils der nicht-elterlichen Phänotypen bzw. Genotypen. In Anerkennung seiner Arbeiten wird heute die genetische Distanz in Morgan (M) bzw. cM (Centi-Morgan) angegeben.

Durch die Entwicklung der molekularen Markersysteme ist die genetische Kartierung nicht nur für den Genetiker interessant, sondern auch Züchter und Molekularbiologen nutzen das Wissen über Kopplungen, so werden z. B. eng gekoppelte Marker in der Pflanzenzüchtung für eine Marker-gestützte Selektion eingesetzt (MELCHINGER, 1990; TANKSLEY *et al.*, 1989).

Zur Erstellung einer Kopplungskarte werden die oben genannten Markersysteme verwendet. Nach der Auswertung der Polymorphismen wird eine Kopplungsanalyse durchgeführt, bei der Schätzwerte für die relativen Distanzen der Marker berechnet werden. Durch Bestimmung der Reihenfolge der Marker werden sogenannte Kopplungsgruppen erstellt.

1.2.3 Einsatz von physikalischen Karten

Anders als genetische Karten basieren physikalische Karten nicht auf Rekombinationshäufigkeiten zwischen zwei Loci, sondern auf den „wahren“, tatsächlichen Abständen entlang des DNA-Fadens. Physikalische Karten spiegeln also die molekularen Distanzen zweier Loci wider.

Die Erstellung von physikalischen Karten wurde durch zwei Entwicklungen möglich: die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE; SCHWARTZ & CANTOR, 1984) und die Entwicklung von Vektoren, die die Klonierung großer DNA-Fragmente erlaubten. Mit Hilfe der Pulsfeldgelelektrophorese wurde die Analyse von Fragmenten weit über 100 kb möglich. Als Vektorsysteme sind als wichtigste das künstliche Hefe-Chromosom (*yeast artificial chromosome*, YAC, BURKE *et al.*, 1987) und das künstliche Bakterien-Chromosomen (*bacterial artificial chromosome*, BAC, SHIZUYA *et al.*, 1992) zu nennen.

Physikalische Karten werden durch Anordnen von DNA-Fragmenten erstellt, die zum Teil identische DNA-Sequenzen enthalten und sich partiell überlappen. Diese zusammenhängenden Bereiche werden *contiguous DNA region* oder *contig* genannt. DNA-Banken mit großen Insertionen (*large insert libraries*) erleichtern die Erstellung von physikalischen Karten (z. B. durch *fingerprinting*, CHUMAKOV *et al.*, 1995), da weniger Klone zusammengefügt werden müssen.

Zur Isolierung eines Gens ist es nur notwendig, einen kleinen Bereich des Genoms physikalisch zu kartieren bzw. zu einem *contig* zusammenzufügen (z. B. SIEDLER & GRANER, 1991, SOROKIN *et al.*, 1994; KLEINE *et al.*, 1995; ASAKAWA & SHIMIZU, 1998). Physikalische Karten werden aber auch in Genomprojekten eingesetzt. Dabei werden Karten für einzelne Chromosomen und auch für ganze Genome erstellt (COULSON *et al.*, 1986; ZHANG & WING, 1997; MOZO *et al.*, 1999).

1.2.4 Karten-gestützte Genklonierung

Physikalische und genetische Karten stehen miteinander in Verbindung. Mit Hilfe eines Vergleichs der beiden Karten läßt sich ein Verhältnis von genetischem zu physikalischem Abstand berechnen, welches oft nicht konstant ist (CIVARDI *et al.*, 1994). Variation tritt sowohl zwischen Arten, also auch zwischen den Chromosomen bzw. Chromosomenabschnitten einer Art auf. Bereiche mit hoher und niedriger Rekombinationsaktivität werden gefunden.

Mit Hilfe einer genetischen Kopplungsanalyse können Gene genetisch lokalisiert werden. Die physikalische Lokalisation und die Isolierung eines Gens kann als Karten-gestützte Klonierung (*map-based cloning, positional cloning*) erfolgen (ARONDEL *et al.*, 1992; GIRAUDAT *et al.*, 1992; BENT *et al.*, 1994; ZHANG *et al.*, 1994; BUSCHGES *et al.*, 1997). Dieser Weg entspricht im wesentlichen der von ORKIN (1986) als „*reverse genetics*“ definierten Strategie. Zur Isolierung werden eng gekoppelte genetische Marker benötigt, die das Gen flankieren. Je enger die Marker mit dem Gen gekoppelt sind, desto leichter ist die Klonierung. Da das Verhältnis genetischer zu physikalischer Distanz nicht konstant ist, läßt sich kein Richtwert angeben, wie weit die Marker maximal entfernt sein sollten. Auch sehr eng gekoppelte Marker können physikalisch noch weit vom Zielgen entfernt sein.

Die eng gekoppelten Marker werden zum Sichten von *large insert libraries* verwendet. Mit Hilfe von anschließenden Analysen wird versucht, die identifizierten Klone zu einem *contig* zusammenzufügen. Diese Analysen sind umso schwieriger, je komplexer das zu untersuchende Genom ist (Anteil repetitiver Sequenzen). Ist es nicht möglich, die Klone zu einem *contig* anzuordnen, können *chromosome walking*-, *chromosome jumping*- und *chromosome linking*-Analysen (POUSTKA & LEHRACH, 1986) angeschlossen werden. TANKSLEY *et al.* stellten 1995 das Konzept des *chromosome landings* vor, welches auf den kombinierten Vorteilen der verbesserten Methoden zur Markererstellung, der Analyse gepoolter Genotypenklassen (MICHELMORE *et al.*, 1991) und nahezu isogener Linien (MARTIN *et al.*, 1991) beruht.

1.2.5 *Large insert libraries*

Als Vertreter der *large insert libraries* sollen die YAC- und BAC-Vektoren vorgestellt werden.

1.2.5.1 YAC-Vektoren

Drei Jahre nach der Erfindung der Pulsfeldgelelektrophorese stand mit dem künstlichen Hefe-Chromosom (*yeast artificial chromosome*, YAC, BURKE *et al.*, 1987) ein Vektorsystem zur Verfügung, das die Klonierung von DNA-Fragmenten von weit mehr als 100 kb ermöglichte.

YACs werden als lineare Chromosomen in den Hefezellen mitotisch weitergegeben. Zur Herstellung von YACs werden ein „linker“ und ein „rechter“ YAC-Arm an die zu klonierenden DNA-Fragmente ligiert. Die Konstrukte werden durch Sphäroplastentransformation in Hefezellen eingebracht. YACs unter einer Größe von ca. 50 kb werden in Hefe mitotisch nicht propagiert.

Die von anderen Vektorsystemen unerreichte Klonierungskapazität der YACs (bis zu 2 Mb, COHEN *et al.*, 1993; CHUMAKOV *et al.*, 1995) und ihre frühe Entwicklung hat zu einer breiten Palette von Anwendungen und Erfolgen geführt. Mit YACs gelang neben der Herstellung der ersten *large insert libraries* unter anderem die erste stabile Transfektion von Säugerzellen mit intakten Gengruppen (KOLCHINSKY & FUNKE, 1995) und eine Reihe von Positionsklonierungen pflanzlicher Resistenzgene (MARTIN *et al.*, 1993; CAI *et al.*, 1997).

YACs haben allerdings auch Nachteile. Die Transformationseffizienz (Sphäroplastentransformation) liegt mit maximal 10^7 cfu/ μ g DNA (BURGERS & PERCIVAL, 1987) relativ niedrig. Ein beträchtlicher Anteil der YACs in einer Bank kann instabil sein: SCHMIDT *et al.* (1994) berichteten von 32 % instabilen Klonen. Repetitive DNA-Sequenzen erhöhen generell die Umordnungswahrscheinlichkeit bei YAC-Insertionen (EYERS *et al.*, 1992; SCHMIDT *et al.*, 1994). Vergleichbare Instabilitätsprobleme sind auch bei verschiedenen konventionellen Plasmiden (KIM *et al.*, 1992) und Cosmiden (LEONARDO & SEDIVY, 1990, YOKOBATA *et al.*, 1990) bekannt.

Besonders chimäre YACs, die durch gemeinsame Klonierung (*co-cloning*) nicht zusammengehöriger DNA-Fragmente oder durch Rekombination während der Transformation entstehen (LARIONOV *et al.*, 1994), verursachen beim *chromosome walking* und *chromosome jumping*

Mißerfolge. Chimäre Klone werden bei der YAC-Klonierung häufig beobachtet (GREEN & OLSON, 1990, KOUPRINA *et al.*, 1994); sie können zwischen einem Drittel (LIBERT *et al.*, 1993) und 60 % (GREEN *et al.*, 1991) aller Klone ausmachen, wobei besonders Klone mit großen Insertionen (über 500 kb) betroffen sind (ANDERSON, 1993).

Bislang sind drei YAC-Banken von Zuckerrüben veröffentlicht worden, die in den Jahren 1992 (EYERS *et al.*), 1993 (KLEINE) und 1994 (KLEIN-LANKHORST *et al.*) fertiggestellt wurden. Die mittleren Insertionsgrößen dieser Banken sind einheitlich recht niedrig (130–140 Mb). Mit Hilfe der YAC-Bank von KLEINE (1993) wurde das Nematodenresistenzgen *HsI^{pro-1}* kloniert (CAI *et al.*, 1997). In dieser Arbeit wurde diese Bank für die Erstellung einer physikalischen Karte der Region des Schossgens eingesetzt. Aus den anderen zwei Banken wurden bisher keine klonierten Gene veröffentlicht.

1.2.5.2 BAC-Vektoren

BAC-Vektoren (*bacterial artificial chromosome*) basieren auf dem F-Plasmid von *Escherichia coli*. Dieser wird in den Zellen einer Bakterienpopulation als superhelikales Plasmid weitgehend stabil vererbt und kann DNA-Fragmente einer Länge von bis zu 1 Mb tragen (WILLETTS & SKURRY, 1987). Seine Kopienzahl ist auf ein oder zwei Plasmide pro Zelle begrenzt, was das Rekombinationspotenzial der vom F-Faktor getragenen DNA-Fragmente reduziert (SHIZUYA *et al.*, 1992). Mittlerweile ist jedoch auch die stabile Klonierung von 300-kb-Fragmenten in Plasmidvektoren gelungen, die in vier bis fünf Kopien pro Zelle vorliegen (TAO & ZHANG, 1998).

Die vorteilhaften Eigenschaften des F-Faktors wurden erstmals von O'CONNOR (1989) und HOSODA *et al.* (1990) für die Klonierung fremder DNA genutzt. Ein breiter Einsatz von F-Faktor-Vektoren begann jedoch erst mit der Entwicklung des BACs (SHIZUYA *et al.*, 1992). Inzwischen sind eine Reihe von BAC-Vektoren, wie z. B. pBeloBAC11 (KIM *et al.*, 1996), pBeloBAC-Kan (Mozo *et al.*, 1998), pBIBAC (HAMILTON *et al.*, 1996; HAMILTON, 1997) und pBACwich (LIN *et al.*, 1999) entwickelt worden.

In dieser Arbeit wurde der Vektor pBeloBAC11 zur Erstellung einer Zuckerrüben-BAC-Bank verwendet. Die Polylinkerregion (*multiple cloning site*) mit singulären Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *Hind*III und *Bam*HI liegt im *lacZ*-Gen. Mit Hilfe des *lacZ*-Gens können rekombinante Klone durch Farbselektion identifiziert werden. Die flankierenden Promotoren T7 und SP6 ermöglichen die Sequenzierung der Insertionsenden und die Her-

stellung von RNA-Sonden für das *chromosome walking*. Die Insertionsgrößen von BACs werden durch eine Restriktion mit *NotI* bestimmt, wobei der Vektor zwei die Polylinkerregion flankierende *NotI*-Schnittstellen besitzt.

Die Anwendungsmöglichkeiten der BAC-Technologie sind sehr breit gefächert. Generell spielen BACs heute bei Projekten zur physikalischen Kartierung und bei der *contig*-Erstellung eine zentrale Rolle, wobei neben klassischer Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (ZWICK *et al.*, 1998; CHOI *et al.*, 1999; JACKSON *et al.*, 1999) zunehmend moderne *fingerprinting*- und *high density*-Technologien zum Einsatz kommen (MAREK & SHOEMAKER, 1997; CAI *et al.*, 1998a, 1998b; DING *et al.*, 1999).

Im botanischen und pflanzenzüchterischen Sektor standen in den letzten Jahren *contig*-Erstellung und -Analysen im Mittelpunkt der BAC-Anwendungen. Neben Vorarbeiten für die Klonierung von Resistenzgenen (NAKAMURA *et al.*, 1997; PATOCCHI *et al.*, 1999) wurde die gezielte Isolierung von *simple-sequence-repeat*-Markern (Mikrosatelliten) mit Hilfe von BACs beschrieben (CREGAN *et al.*, 1999). Für die Erzeugung transgener Pflanzen eröffnete die Entwicklung des *binary*-BAC-Systems neue Perspektiven, weil erstmals ganze *cluster* von Genen in einem Stück kloniert und über *Agrobacterium*-Transformation intakt ins pflanzliche Genom integriert werden konnten (HAMILTON *et al.*, 1996; HAMILTON, 1997). Der pBACwich-Vektor ermöglicht sogar eine Transformation durch ortsspezifische Rekombination (LIN *et al.*, 1999).

BAC-Banken sind inzwischen für viele Pflanzen erstellt wurden, so existieren z. B. mehrere Banken für *A. thaliana*, Reis, Baumwolle, Tomate, Mais und Soja (<http://hbz.tamu.edu/bacindex.html>, <http://www.genome.clemson.edu>), aber auch BAC-Banken von z. B. Apfel, Banane und Pfirsich sind erstellt worden. Die durchschnittlichen Insertionsgrößen pflanzlicher BAC-Banken liegen überwiegend zwischen 100 kb und 150 kb (<http://hbz.tamu.edu/bacindex.html>, <http://www.genome.clemson.edu>). Aber auch BAC-Banken mit deutlich kleineren und auch deutlich größeren durchschnittlichen Insertionsgrößen sind erstellt worden (45 kb, *Raphanus sativus*; 210 kb, Weizen; beide: <http://hbz.tamu.edu/bacindex.html>).

1.2.5.3 Vergleich von YAC- und BAC-Vektoren

Eine gemeinsame Eigenschaft von YACs und BACs ist, dass sie in der Wirtszelle im Normalfall als Einzelkopie vorliegen. Beim Vergleich mit YACs sind BAC-Vektoren in fast allen Kategorien überlegen. Nur ihre Klonierungskapazität liegt mit deutlich weniger als 1 Mb weit unterhalb der bei YACs bekannten Grenzen. Während der größte bislang publizierte BAC eine Insertionsgröße von rund 725 kb hatte (ZIMMER & GIBBINS, 1997), sind YACs von rund 2 Mb beschrieben worden (COHEN *et al.*, 1993; CHUMAKOV *et al.*, 1995). Auch die durchschnittliche Insertionsgröße von YAC-Banken ist meist größer als die vergleichbarer BAC-Banken. Für Pflanzen liegen hier die höchsten Werte bei 420 kb (CREUSOT *et al.*, 1995) gegenüber 210 kb bei BACs (ZHANG, 1999). Neben ihrer hohen Klonierungskapazität haben YACs den Vorteil, dass sie unterhalb einer Größe von rund 50 kb nicht mitotisch propagiert werden. Diese Untergrenze erleichtert die Größenselektion von Restriktionsfragmenten bei der Erstellung von YAC-Banken. Unter Umständen ist gar keine Größenselektion nötig (KLEINE *et al.*, 1998).

Sieht man jedoch von diesen beiden Eigenschaften der YACs ab und vergleicht andere Aspekte der beiden Systeme, so spricht alles für den Einsatz von BACs. Sie können in Stämmen von *E. coli* vermehrt werden, die fünfmal so schnell wachsen wie Hefen (FRIJTERS *et al.*, 1997). Die höchsten bislang geschätzten Prozentsätze an chimären BACs lagen bei 5–6 % (KIM *et al.*, 1996; ZHU *et al.*, 1999). Häufig wurden überhaupt keine chimären Klone beobachtet (z. B. WANG *et al.*, 1995; NISHIMURA *et al.*, 1998; LI *et al.*, 1999). Die meisten Autoren fanden auch nach rund 100 Bakteriengenerationen keinerlei Hinweise auf instabile Insertionen (z. B. CAI *et al.*, 1995; NAKAMURA *et al.*, 1997; SALIMATH & BHATTACHARYYA, 1999), während in anderen Fällen bis zu 5 % der Klone instabil waren (ZHU *et al.*, 1999). Hefen werden durch Sphäroplastentransformation ($< 10^7$ cfu/ μ g DNA) transformiert, BACs durch Elektroporation in *E. coli* DH10B (10^{10} cfu/ μ g DNA) eingebracht (WOO *et al.*, 1994).

In der Nutzung bieten BACs einige Vorteile. Da sie leicht zu modifizieren sind (MEJIA & MONACO, 1997; YANG *et al.*, 1997b), werden sie in funktionellen Studien eingesetzt (ANTOCH *et al.*, 1997; HEIJNA *et al.*, 1998). Für die physikalische Kartierung und Positionsklonierung sind BACs auf Grund der oben genannten Eigenschaften vorteilhafter als YACs. Das große Automatisierungspotenzial ermöglicht hohe Analysegeschwindigkeiten bei DNA-*finger-*

printing und anderen Anwendungen, die mit YACs nicht möglich sind. Mittlerweile werden Roboter für Klonselktion, DNA-Minipräparationen und die Erstellung von *high-density*-Filtern eingesetzt (MEIER-EWERT *et al.*, 1993; MAREK & SHOEMAKER, 1997). In Sequenzanalysen mit Hilfe der DNA-Chip-Technologie lassen sich BACs problemlos eingliedern. Daher haben BACs die YACs mittlerweile als dominierende Quelle für physikalische Kartierungen und Großsequenzierungen abgelöst (BOYSEN *et al.*, 1997).

1.3 Das Schossgen der Zuckerrübe

Das Schossgen (Gen *B*) der Zuckerrübe wurde zum ersten Mal von MUNERATI (1931) in kommerziellen Linien beobachtet. Eine erste genetische Lokalisation des Gens erfolgte bereits in den vierziger Jahren durch KELLER (1936) und ABEGG (1936) sowie OWEN *et al.* (1940) und OWEN & RYSER (1942) auf der sogenannten *Y-R-B*-Kopplungsgruppe (*Y* bzw. *R*: gelbe bzw. rote Hypokotylfarbe). OWEN berichtete 1954, dass das Gen *B* für die thermale Induktion des Schossens verantwortlich ist. Die Einjährigkeit wird von dem dominanten Allel *B* des Schossgens kontrolliert (ABE *et al.*, 1997). ABEGG (1936), OWEN & MCFARLANE (1958) und SADEGHIAN (1993) fanden heraus, dass die Penetranz des Gens sowohl von Umwelteinflüssen als auch von genetischen Faktoren beeinflusst wird. Zur Initiierung des Schossens sind für homozygot einjährige Pflanzen (*BB*) Langtagsbedingungen notwendig. Ein komplizierteres Verhalten bei heterozygotem Zustand des Schossgens wurde von SHIMAMOTO *et al.* (1990) und BOUDRY *et al.* (1994) beschrieben. Heterozygote Pflanzen verhalten sich einjährig, wenn sie günstige Umweltbedingungen für das Schossen vorfinden, während sie sich wie zwei-jährige Pflanzen verhalten, wenn sie in Spät-Juni oder Juli gesät werden.

Im Projekt zur Klonierung des Schossgens wurde dieses mit Hilfe von AFLP-Markern genetisch feinkartiert (EL MEZAWY, 2001). Diese genetische Karte stellt die Grundlage für die in dieser Arbeit erstellte physikalische Karte der Region des Schossgens dar.

Nicht nur das Schossverhalten der Zuckerrübe ist Gegenstand von molekularen Analysen. Weitreichende Untersuchungen zur Blühinduktion und Blütenformation werden an verschiedenen Pflanzen durchgeführt. Besonders intensiv werden diese Aspekte bei *Arabidopsis thaliana* untersucht.

1.4 *Arabidopsis thaliana* als Modellpflanze

Arabidopsis thaliana wird allgemein als Modellpflanze für physiologische, molekulare und genetische Untersuchungen verwendet. Durch ihre relativ kleine Genomgröße (123,5 Mb; MOZO *et al.*, 1999; 130 Mb; CREUSOT *et al.*, 1995) ist sie als Modellpflanze besonders geeignet. Der Anteil an repetitiven Sequenzen ist gering. Die Sequenzierung der fünf Chromosomen von *Arabidopsis thaliana* ist abgeschlossen.

Physiologische Studien führten zu drei Modellen zur Kontrolle des Schossens und Blühens (LEVY & DEAN, 1998): das Florigen-Konzept, die *nutrient diversion*-Hypothese und das *multifactorial control*-Modell. Das erste Modell ging von der Annahme eines Hormons aus, welches Signale von vegetativen Sprossen zu reproduktiven „Empfängern“ übermitteln sollte. Die *nutrient diversion*-Hypothese nahm an, dass induktive Behandlungen zu einer Erhöhung von Assimilaten führte, die zum apikalem Meristem transportiert werden. Das neueste Modell der multifaktoriellen Kontrolle der Blühinduktion geht von einer Reihe von Promotoren und Inhibitoren, einschließlich Phytohormonen und Assimilaten aus.

Die Induktion und Entwicklung der generativen Organe von *A. thaliana* wird intensiv untersucht. Dabei wird versucht, ein Netzwerk der beteiligten Gene zu entwickeln. Das momentane Modell enthält vier Signalwege. Der Repressor-Weg hemmt generell die Umsteuerung auf generatives Wachstum. Die Hemmung kann durch drei Signalwege aufgehoben werden. Der photoperiodische Weg (*photoperiodic promotion*) reagiert auf Langtag- und Kurztagbedingungen. Der vernalisationsabhängige Weg (*vernalization promotion*) reagiert auf eine Zeitphase mit moderater Temperatur. Daneben gibt es noch einen autonomen Weg (*autonomous promotion*).

Eine Reihe von *Arabidopsis*-Mutanten, die eine Abweichung im Blühverhalten aufweisen (z. B. KOORNEEF *et al.*, 1991), wurde durch Mutagenese erzeugt. Die Einordnung in die Signalwege und Charakterisierung der Mutanten erfolgte mit Hilfe von Kreuzungen zwischen verschiedenen Blühmutanten. Inzwischen sind einige Blühgene kloniert worden. Eine Übersicht über die Blühgene und die Arbeitsgruppen, die diese bearbeiten, ist auf der Internet-Seite http://www.salk.edu/LABS/pbio_w/flower_web.html dargestellt.

Übersichten über den aktuellen Forschungsstand und die Modelle der Blühinduktion sind z. B. bei LAURIE (1997), PINEIRO & COUPLAND (1998), MA (1998) und LEVY & DEAN (1998) nachzulesen.

1.5 Ziele der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die physikalische Kartierung der Region des Schossgens (Gen *B*) der Zuckerrübe als Vorleistung für die Klonierung des Gens. Folgende Aufgaben wurden bearbeitet:

1. Sichten einer YAC-Bank mit eng gekoppelten AFLP-Markern
 2. Erstellung eines *contigs* aus isolierten YAC-Klonen
 3. Erstellung einer BAC-Bank der Zuckerrübe
 4. Charakterisierung der BAC-Bank
-

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

In der Tabelle 2.1.1 sind die in dieser Arbeit zum Einsatz gekommenen Chemikalien aufgeführt. Die verwendeten Enzyme sind in Tabelle 2.1.2 zusammengestellt.

Tabelle 2.1.1: Verwendete Chemikalien.

Chemikalien	Hersteller
α -D-Glucose	Serva, Heidelberg
2-Mercaptoethanol (β -Mercaptoethanol)	Biomol, Hamburg
Adenosin-5'-triphosphat	Boehringer, Mannheim
Agarose InCert™	Biozym, Hess. Oldendorf
Agarose NuSieve® GTG	Biozym, Hess. Oldendorf
Agarose SeaKem® LE	Biozym, Hess. Oldendorf
Agarose SeaPlaque® GTG	Biozym, Hess. Oldendorf
Ammoniumperoxodisulphat	Merck, Darmstadt
Bacto® Agar	Difco Laboratories, Detroit MI, USA
Bacto® Tryptone	Difco Laboratories, Detroit MI, USA
Bacto® Yeast Extract	Difco Laboratories, Detroit MI, USA
Borsäure	Merck, Darmstadt
Chloroform	Roth, Karlsruhe
D (+)-Saccharose	Roth, Karlsruhe
Dimethylformamid	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid	Merck, Darmstadt

Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Essigsäure (100 %)	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid (1 % w/v in Wasser)	Serva, Heidelberg
Hybond™-N+ (Nylon-Transfermembran)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Hyperfilm MP	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
IPTG	Roth, Karlsruhe
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Kaliumacetat	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Long Ranger-Lösung	Biozym, Hess. Oldendorf
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Millipore VSWP 02500 Filter	Millipore, Eschborn
Monyl-Planktonnetz	Hydro-Bios, Kiel
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natrium-Dodecylsulphat (SDS)	Serva, Heidelberg
N-Lauroylsarkosinat	Sigma, Deisenhofen
Phenol (Biophenol-Tris)	Biomol, Hamburg
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roth, Karlsruhe
Rinderserumalbumin (Albumin Fraktion V)	Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Spermin	Sigma, Deisenhofen
Spermin (Tetrahydrochlorid)	Sigma, Deisenhofen
TEMED	Sigma, Deisenhofen

Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Roth, Karlsruhe
X-Gal	Roth, Karlsruhe

Alle Chemikalien hatten den Reinheitsgrad *pro analysi*. Falls nicht anders angegeben, wurde für alle Lösungen destilliertes Wasser verwendet, das mit dem Gerät „Seradest RO-KM 60“ (Seral, Ransbach-Baumbach) gewonnen wurde. Zu sterilisierende Lösungen wurden bei 121°C und 1,2 bar für 20 Min. autoklaviert (Varioklav 500EV, H+P Labortechnik, Ober-schleißheim).

Tabelle 2.1.2: Verwendete Enzyme.

Enzym	Hersteller
Ampli- <i>Taq</i> -Polymerase	Perkin Elmer, Weiterstadt
<i>EcoRI</i>	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
GELase	Biozym, Hess. Oldendorf
<i>HaeIII</i>	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
<i>HindIII</i>	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
HK™ thermolabile Phosphatase	Biozym, Hess. Oldendorf
Klenow-Enzym	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Lysozym	Serva, Heidelberg
Lyticase	Sigma, Deisenhofen
<i>MseI</i>	New England Biolabs, Frankfurt/M
<i>NotI</i>	New England Biolabs, Frankfurt/M
<i>Plasmid-safe ATP-dependent DNase</i>	Biozym, Hess. Oldendorf
Proteinase K	Merck, Darmstadt

T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Frankfurt/M
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
<i>Taq</i> I	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

2.2 DNA-Längen- und Größenstandards

Die Tabelle 2.2.1 bietet eine Übersicht über die in dieser Arbeit zum Einsatz gekommenen DNA-Standards.

Tabelle 2.2.1: Verwendete DNA-Standards.

Standard	Hersteller
λ / <i>Hind</i> III-DNA	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
λ -DNA	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
λ -Leiter	Biorad, München
<i>low Range</i> -PFG-Marker	New England Biolabs, Frankfurt/M
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> AB1380	eigene Herstellung nach KLEINE <i>et al.</i> (1993)
SequaMark™ for isotopic methods	Biozym, Hess. Oldendorf

2.3 Biologisches Material/Organismen

2.3.1 Bakterienstämme, Vektoren und DNA-Sonden

Folgende Bakterienstämme sind im Laufe dieser Arbeit verwendet worden:

- *E. coli* DH10B: Dieser Stamm wurde sowohl zur BAC-Klonierung als auch zur Klonierung von kleineren Fragmenten wie z. B. PCR-Produkten verwendet. Die zur Transformation durch Elektroporation eingesetzten kompetenten Zellen wurden nach dem Protokoll von KIM (1999) selbst hergestellt.
-

-
- ElectroMAX DH10B™ Cells: Unter dieser Bezeichnung werden von Life Technologies, Karlsruhe elektrokompetente Zellen des Stammes *E. coli* DH10B vertrieben. Diese wurden ausschließlich zur BAC-Klonierung eingesetzt.
 - *Saccharomyces cerevisiae* AB1380: Dieser Hefe-Stamm ist der Wirtsstamm der verwendeten YAC-Bank (KLEINE, 1993).

Die zwei folgenden Vektoren wurden in dieser Arbeit verwendet:

- pGEM-T: Dieser Vektor (Promega, Madison, USA) diente zur Klonierung von PCR-Fragmenten. Zur Selektion wurden dem Medium 50 µg/ml Ampicillin zugegeben.
- pBeloBAC11: Der bei Kim *et al.* (1996) beschriebene BAC-Vektor wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. THOMAS ALTMANN, Berlin-Golm zur Verfügung gestellt. Zur Selektion wurde dem Medium 12,5 µg/ml Chloramphenicol zugegeben.
- pBeloBAC-Kan: Der zur BAC-Klonierung mit dem Enzym *EcoRI* verwendete Vektor pBeloBAC-Kan (MOZO *et al.*, 1998) wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. THOMAS ALTMANN, Berlin-Golm zur Verfügung gestellt.

Für Hybridisierungen wurden die in Tabelle 2.3.1.1 angegeben, von den YAC-Enden abgeleiteten DNA-Sonden verwendet. Als Sonden wurden PCR-Produkte verwendet. Ausnahmen stellten die Sonden pBR322, FRI-C und FCA-γ dar. pBR322 wurde als vollständiges Plasmid zur Hybridisierung verwendet. Als Sonde FRI-C wurde die 1,8 kb große Insertion des Plasmids pFRI-C (Datenbank-Nr.2319) mit *EcoRI* herausgeschnitten. Die 4,6 kb große Insertion des Plasmids pFCA-γ (Datenbank-Nr. 2320) wurde mit *EcoRI/XhoI*-Restriktion isoliert. Die Sonden zur Charakterisierung der BAC-Bank sind in Tabelle 2.15.1 aufgeführt.

Tabelle 2.3.1.1: Von den YAC-Enden abgeleitete DNA-Sonden. Die Herstellung der Sonde erfolgte in Form einer PCR. Die Primer und die als Matrize dienende YAC-DNA sind angegeben. Für Y26B6R und Y102H12L wurden klonierte YAC-Enden als Matrize verwendet. Die entsprechenden Datenbank-Nummern sind angegeben. Die Primersequenzen sind im Anhang 8.3 aufgeführt.

Sonde (Datenbank-Nr.)	Matrizen-DNA (Datenbank-Nr.)	Primerkombination
Y5C6R (2399)	Y5C6	Y5C6R1/Y5C6R2
Y7A8L (2400)	Y7A8	Y7A8L2/Y7A8L3
Y7A8R (2401)	Y7A8	Y7A8R2/Y7A8R5
Y29B6L (2402)	Y29B6	Y29B6L2/Y29B6L3
Y29B6R (2403)	p29B6R (2363)	M13 forward/M13 reverse
Y49F7L (2404)	Y49F7	Y49F7L1/Y49F7L2
Y49F7R (2405)	Y49F7	IR-Y49F7R1/IR-Y49F7R2
Y67G1L (2406)	Y67G1	Y67G1L2/Y67G1L3
Y67G1R (2407)	Y67G1	Y67G1R1/Y67G1R2
Y73G8L (2408)	Y73G8	Y73G8L1/Y73G8L2
Y73G8R (2409)	Y73G8	Y73G8R1/Y73G8R2
Y81D10L (2410)	Y81D10	Y81D10L2/Y81D10L3
Y81D10R (2411)	Y81D10	Y81D10R2/IR-Y81D10R7
Y85A6L (2412)	Y85A6	Y85A6L2/Y85A6L3
Y89F10L (2413)	Y89F10	Y89F10L1/Y89F10L2
Y89F10R (2414)	Y89F10	Y89F10R1/Y89F10R2
Y99F8L (2415)	Y99F8	Y99F8L1/Y99F8L2

Y99F8R (2416)	Y99F8	IR-Y99F8R1/IR-Y99F8R2
Y101A7L (2417)	Y101A7	Y101A7L2/Y101A7L3
Y101A7R (2418)	Y101A7	Y101A7R1/Y101A7R2
Y102H12L (2419)	p102H12L2 (2362)	M13 forward/M13 reverse
Y102H12R (2420)	Y102H12	Y102H12R4/Y102H12R9

2.3.2 Pflanzenmaterial

In dieser Arbeit wurden die Zuckerrübenlinien A906001, KWS2320 und 960701 verwendet.

Die Linie A906001 ist eine Translokationslinie ($2n = 18$), die einen Teil des *Beta procumbens*-Chromosoms 1 mit dem Nematodenresistenzgen *HsI^{pro-1}* trägt (CAI *et al.* 1997). Diese Linie ist der mütterliche Elter der Kartierungspopulation 960701 (EL MEZAWY, 2001). DNA dieser Linie wurde als Referenz-DNA für das Sichten der YAC-Bank verwendet.

Die Linie KWS2320 wurde freundlicherweise von der Firma Kleinwanzlebener Saatzucht AG (KWS), Einbeck zur Verfügung gestellt. Die zweijährige, doppelhaploide (DH) Linie entstammt einer Kreuzung zweier monogemer Linien und wurde durch Parthenogenese und Colchizinierung aus Ovulae der F_1 gewonnen. Die Linie repräsentiert hinsichtlich der Ertrags- und Qualitätsparameter die volle Leistung des KWS-Testsortiments (B. SCHULZ, KWS, pers. Mitteilung). Diese auch im Genomprojekt GABI-BEET verwendete Linie wurde für die Erstellung einer Zuckerrüben-BAC-Bank eingesetzt.

Die Population 960701 ist die für die Kartierung des Schossgens erstellte und spaltende F_2 -Population (EL MEZAWY, 2001). DNA von Pflanzen dieser Linie wurde für die genetische Kartierung des Schossgens und der YAC-Enden benutzt.

Arabidopsis thaliana Col wurde als Kontroll-DNA bei der Hybridisierung von Sonden aus *A. thaliana* verwendet.

2.4 DNA-Isolierung

In diesem Abschnitt werden nur die allgemeinen Methoden beschrieben. Spezielle Methoden, wie zum Beispiel die Isolierung von Megabasen-DNA werden in spezifischen Abschnitten weiter unten beschrieben.

Nach der Isolation wurden die DNAs auf Ethidiumbromid-gefärbten Agarose-Gelen hinsichtlich ihrer Reinheit und Konzentration überprüft.

2.4.1 Genomische DNA aus Pflanzen

Die Isolierung von Gesamt-DNA aus Blattmaterial erfolgte nach einem veränderten Protokoll von SAGHAI-MAROOF *et al.* (1984).

Getrocknetes, junges Blattmaterial wurde mit Hilfe einer Metallkugel in einer Retschmühle zerkleinert. Das Pulver wurde in 1,25 ml 1 x CTAB-DNA-Extraktionspuffer (65°C) resuspendiert. Nach 30 bis 60 Min. bei 65°C und anschließender Abkühlung auf Raumtemperatur wurden 500 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugegeben, gemischt und für 10 Min. im Überkopfschüttler inkubiert. Nach der Phasentrennung wurde die wässrige Phase mit 40 µg/ml RNase versetzt und für 30 Min. bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 700 µl Isopropanol und vorsichtigem Schwenken fiel die DNA aus. Die ausgefällte DNA wurde in 1 ml 76 % Ethanol/0,2 M Ammoniumacetat gewaschen (10 Min.). Nach Dekantieren der Lösung wurde die DNA mit 500 µl 76 % Ethanol/10 mM Ammoniumacetat versetzt. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die DNA getrocknet. Das anschließende Rücklösen der DNA erfolgte über Nacht auf einem Überkopfschüttler.

2.4.2 Plasmid-DNA

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienklonen wurden drei Verfahren angewendet: Isolierung mittels des QIAfilter Plasmid Maxi/Midi Kits, mittels des GFX™ MicroPlasmid Prep Kits oder mittels einer Schnellmethode.

2.4.2.1 DNA-Präparation mit dem QIAfilter Plasmid Maxi/Midi Kit

Für die Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA (5-20 µg) wurde das Protokoll der Firma Qiagen, Hilden angewendet. Diese Methode basiert auf der alkalischen Lyse von BIRNBOIM &

DOLY (1979). Nach der alkalischen Lyse erfolgt die Abtrennung der genomischen DNA nach Neutralisierung als DNA-Protein-SDS-Komplex. Die unter diesen Bedingungen renaturierte Plasmid-DNA kann weiter über die im Kit enthaltenden Säulen gereinigt werden. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

2.4.2.2 Minipräparation von Plasmid-DNA mit GFX™ Micro Plasmid Prep Kit

Diese Methode wurde eingesetzt, wenn nur wenige saubere DNA benötigt wurde. Diese Methode basiert wie die schon oben beschriebene Methode auf einer alkalischen Lyse mit anschließender Aufreinigung über eine Anionenaustauscher-Säule und wurde nach Herstellerprotokoll durchgeführt.

2.4.2.3 Schnellmethode zur Erfolgskontrolle nach Transformation

Zur Isolierung kleinerer, nicht-sauberer Plasmid-DNA-Mengen, z. B. für die Erfolgskontrolle nach einer Transformation, wurde eine *rapid-boil*-Methode angewendet, die bei HOLMES & QUIGLEY (1981) beschrieben ist.

2.5 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist es möglich, auch geringe DNA-Mengen bezüglich der Existenz bestimmter DNA-Sequenzen zu untersuchen (MULLINS & FALONA, 1987). Die PCR wurde beim Sichten der YAC-Bank (s. 2.11.6) und bei der Sequenzierung (s. 2.9) verwendet. Spezielle PCR-Anwendungen sind in den entsprechenden Abschnitten beschrieben.

Die PCR wurde mit den *Taq*-DNA-Polymerase und den Reagenzien der Firmen Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) und Perkin Elmer (Weiterstadt) sowie einem GeneAmp PCR System 9600 (Perkin Elmer, Weiterstadt) durchgeführt.

Ein PCR-Ansatz (20 µl) enthielt neben 1-30 ng Matrizen-DNA 150 µM dNTP-Mix und 0,5 µM der beiden einzusetzenden Primer. Die Reaktion wurde in 1 x PCR-Puffer mit 0,5 *unit* *Taq*-DNA-Polymerase (beides: Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) durchgeführt.

Einer anfänglichen Denaturierung (94°C/30 Sek.) folgten 28-35 Amplifikationszyklen. Ein Zyklus besteht aus 30 Sek. Denaturierung bei 94°C, 30 Sek. *annealing* und 1-3 Min. Elon-

gation bei 72°C. Die *annealing*-Temperatur wurde der physikalischen Schmelztemperatur der jeweiligen Primer, die Elongationszeit der erwarteten Produktgröße angepaßt.

2.6 Die *amplified fragment length polymorphism*-Technik (AFLP)

Die AFLP-Technik umfaßt nach VOS *et al.* (1995) im Wesentlichen folgende Schritte: Restriktion der zu untersuchenden DNA mit zwei Restriktionsenzymen (hier: *EcoRI* und *MseI*), Ligation von Adaptern an die DNA-Enden, Präamplifikation und Amplifikation mit spezifischen, selektiven Primern. Im Gegensatz zur Methode von VOS *et al.* (1995) wurde eine nicht-radioaktive Methode eingesetzt, bei der ein Fluoreszenz-markierter *EcoRI*-Primer verwendet wurde.

2.6.1 Restriktion/Ligation

Für die Restriktion wurden in einem 30 µl-Ansatz 100 ng DNA mit je 4 *units EcoRI* (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) und *MseI* (New England Biolabs, Frankfurt/M) in 1 x Restriktions-/Ligationspuffer für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Zur Ligation wurden je Ansatz weitere 10 µl zugegeben. Diese enthielten 1 *unit* T4-DNA-Ligase, 5 µmol *EcoRI*-Adapter, 50 µmol *MseI*-Adapter (Tabelle 2.6.1.1) und 1 mmol ATP in 1 x Restriktions-/Ligationspuffer. Die Proben wurden für weitere drei Stunden bei 37°C inkubiert. Für die Präamplifikation wurde der Ansatz mit T_{0,1}E-Puffer eins zu fünf verdünnt.

5 x Restriktions-/Ligationspuffer

Tris	50	mM	(mit 1 M Essigsäure auf pH 7,5 einstellen)
Magnesiumacetat	50	mM	
Kaliumacetat	250	mM	
Dithiotreitol	25	mM	
Rinderserumalbumin	250	mg/ml	

T_{0,1}E-Puffer

Tris 10 mM (mit 1 M Essigsäure auf pH 8 einstellen)

EDTA 0,1 mM

Tabelle 2.6.1.1: Sequenzen der verwendeten AFLP-Adapter. Die komplementären Bereiche der doppelsträngigen Adapter sind **fett** dargestellt.

<i>MseI</i> -Adapter		<i>EcoRI</i> -Adapter	
5' - GACG ATGAGTCCTGAG -3'		5' - CTCGTAG ACTGCGTACC -3'	
3' - TACTCAGGACTCAT -5'		3' - CTGACGCATGGTTAA -5'	

2.6.2 Präamplifikation

Für die Präamplifikation wurden je 5 µl des verdünnten Restriktions-/Ligationsansatzes und 15 µl Präamplifikationsmix eingesetzt. Für die PCR wurde ein GeneAmp PCR System 9600 Thermocycler (Perkin Elmer, Weiterstadt) verwendet. Das PCR-Protokoll ist in Tabelle 2.6.2.1 aufgezeigt. Nach der PCR wurden die Ansätze zehnfach mit T_{0,1}E-Puffer (s. 2.6.1) verdünnt und bei -20°C gelagert.

Tabelle 2.6.2.1: PCR-Programm für die Präamplifikation.

Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
94°C	30 Sek.	1
94°C	30 Sek.	
56°C	30 Sek.	23
72°C	60 Sek.	
72°C	300 Sek.	1
4°C	∞	

Präamplifikationsmix

10 x Ampli- <i>Taq</i> -Polymerase-Puffer (Perkin Elmer, Weiterstadt)	2	μl
dNTP-Mix (2mM)	2	μl
<i>EcoRI</i> -A-Primer (50 ng/μl)	0,6	μl
<i>MseI</i> -C-Primer (50 ng/μl)	0,6	μl
Ampli- <i>Taq</i> -Polymerase (5 units/μl, Perkin Elmer, Weiterstadt)	0,08	μl
dest. Wasser	ad 15	μl

2.6.3 Amplifikation

Für die Amplifikation wurden Primer mit drei selektiven Basen benutzt. Für die nicht-radioaktive Detektion wurden Fluoreszenz-markierte *EcoRI*+3-Primer verwendet, die als erste selektive Base ein Adenin enthielten.

Zur Durchführung wurden 5 μl der verdünnten Präamplifikation mit 15 μl Amplifikationsmix versetzt. Die anschließende *touch down*-PCR (Tabelle 2.6.3.1) wurde auf einem GeneAmp PCR System 9600 (Perkin Elmer, Weiterstadt) durchgeführt.

Tabelle 2.6.3.1: *touch down*-PCR-Programm für die Amplifikation.

Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
94°C	30 Sek.	1
94°C	30 Sek.	
65°C – 0,7°C/Zyklus	30 Sek.	13
72°C	60 Sek.	
94°C	30 Sek.	
56°C	30 Sek.	23
72°C	60 Sek.	
72°C	300 Sek.	1
4°C	∞	

Amplifikationsmix:

10 x Ampli- <i>Taq</i> -Polymerase-Puffer (Perkin Elmer, Weiterstadt)	2	μl
dNTP-Mix (2mM)	2	μl
<i>EcoRI</i> +3-Primer (50 ng/μl)	0,1	μl
<i>MseI</i> +3-Primer (50 ng/μl)	0,6	μl
Ampli- <i>Taq</i> -Polymerase (5 <i>units</i> /μl, Perkin Elmer, Weiterstadt)	0,08	μl
dest. Wasser	ad 15	μl

2.6.4 Analyse und Detektion der Amplifikate

Die Analyse der amplifizierten Fragmente erfolgte auf Sequenziergeräten (LiCor DNA *sequencer*) von MWG Biotech, Ebersberg. Zur Analyse wurden die Proben nach Zugabe von einem Volumen Auftragspuffer für 3 Min. denaturiert (94°C). Je 1 μl Probe wurden auf ein 8 %iges Polyacrylamid-Gel (nach Geräteherstellerprotokoll) aufgetragen.

2.7 Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)

Die zentrale Technik zur Untersuchung von hochmolekularen DNA-Molekülen ist die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE, SCHWARTZ & CANTOR, 1984), die heute meist in CHEF-Systemen (*contour-clamped homogenous fields*, CHU *et al.*, 1986) durchgeführt wird. In dieser Arbeit wurde eine PFGE-Apparatur des Typs CHEF DR[®] II von BioRad, München verwendet.

In dieser Arbeit wurde die PFGE zur Untersuchung von YACs und BACs eingesetzt:

- Bestimmung der Insertionsgrößen von YACs (s. 2.11.8)
- Analyse isolierter hochmolekularer Zuckerrüben-DNA (s. 2.12.1)
- Größenselektion nach Partialrestriktion (s. 2.12.4)
- Insertionsgrößenbestimmung von BACs (s. 2.12.9.2)

Die in dieser Arbeit verwendete Methode lehnt sich an die von KLEINE (1993) beschriebene an. Für die Elektrophorese wurden 1 %ige Agarose-Gele verwendet. Als Agarose wurde SeaKem[®] LE-Agarose (Biozym, Hess. Oldendorf) eingesetzt. Als Laufpuffer diente 0,5 x TBE-Puffer (45 mM Tris, 45 mM Borsäure, 0,5 mM EDTA). Der Reorientierungswinkel betrug 120°. Die Größenbestimmung erfolgte mit Hilfe von Hefe-Chromosomen und des *low range*-PFG-Markers (New England Biolabs, Frankfurt/M). Die Gelapparaturen wurde auf 14°C (Kühlpumpe) gekühlt. Standardbedingungen waren eine Spannung von 200 V, ein Pulszeitgradient von 60-90 Sek. und eine Laufzeit von 16 h. Abweichungen von diesem Protokoll sind in den entsprechenden Abschnitten beschrieben.

Zur Analyse der Gele wurden diese mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht ausgewertet.

2.8 SOUTHERN-Analyse

Diese molekularbiologische Standardmethode, die von SOUTHERN 1975 das erste Mal beschrieben wurde, dient zum Nachweis von homologen DNA-Sequenzen durch Verwendung von markierten DNA-Sonden.

Die Methode besteht aus dem Transfer und der Fixierung der zu untersuchenden DNA auf eine Membran. Die nachfolgende Hybridisierung mit markierten DNA-Sonden erlaubt die Identifizierung spezifischer DNA-Fragmente bzw. –Fragmentmuster.

2.8.1 SOUTHERN-Transfer

Vor dem SOUTHERN-Transfer (SOUTHERN, 1975) wurde die zu untersuchende DNA gelelektrophoretisch aufgetrennt. Zum besseren Transfer wurde das Gel für drei Minuten mit UV-Licht (306 nm) bestrahlt. Der Transfer erfolgte auf eine positiv geladene Nylonmembran (Hybond™ N+, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) mit zwei Verfahren: Transfer mittels Kapillarkraft oder Vakuumtransfer. Bei beiden Verfahren wurde als Transferlösung 0,5 M NaOH/1,5 M NaCl verwendet.

2.8.1.1 Transfer der DNA

2.8.1.1.1 Transfer mittels Kapillarkraft

Diese Variante des Transfers ist die herkömmlich verwendete Methode und ist bei SAMBROOK *et al.* (1989) beschrieben. Das zugrunde liegende Prinzip ist die Ausnutzung der Kapillarkraft, die durch Verwendung von saugfähigen Papiertüchern erzeugt wird. Der Transfer dauerte zwischen 16 und 24 h.

2.8.1.1.2 Vakuumtransfer

Diese Variante des Transfers nutzt die Saugkraft eines Unterdrucks aus. Der Transfer ist in einer Stunde bei einem Unterdruck von 0,5 bar abgeschlossen. Das verwendete Gerät von der Firma Biometra, Göttingen (BIOMETRA® Vacu Blot 11) wurde nach Herstellerangaben eingesetzt.

2.8.1.2 Fixierung der DNA

Um die transferierte DNA an der Membran kovalent zu fixieren, wurde die Membran für 20 Min. bei 80°C „gebacken“. Die Membran wurde direkt zur Hybridisierung verwendet oder bei Raumtemperatur trocken gelagert.

2.8.2 Radioaktive Hybridisierung mit ^{32}P

Die Markierung der Sonden-DNA erfolgte mit der *random priming*-Methode (FEINBERG & VOGELSTEIN, 1983). Die Sonden wurden jeweils doppelt mit $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ -dATP und $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ -dCTP markiert. Die genaue Zusammensetzung der Markierungsreaktion ist in Tabelle 2.8.2.1 angegeben. Die Markierungsreaktion wurde für mindestens eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Abtrennung nicht eingebauter Nukleotide erfolgte durch eine Gelfiltration mit Sephadex-G-50 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Vor der Hybridisierung wurde die Sonde denaturiert.

Die Durchführung der Hybridisierung folgte dem Protokoll von SAMBROOK *et al.* (1989). Die Membranen wurde für 3-5 h bei 65°C vorhybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte bei 65°C in Glasröhrchen für 24 h im Drehinkubator (Bachhofer, Reutlingen). Als Hybridisierungslösung wurde die in SAMBROOK *et al.* (1989) beschriebene verwendet.

Zur Entfernung nicht-spezifisch gebundener Sonden-DNA wurden die Membranen zweimal mit $0,5 \times \text{SSC}/0,2\%$ (w/v) SDS (SAMBROOK *et al.*, 1989) für 30 Min. bei 60°C gewaschen. Die feuchten Membranen wurden in Folienschläuche verpackt. Zur Detektion der radioaktiven Signale wurde ein Röntgenfilm (Hyperfilm MP, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) verwendet. Die Exposition bei -70°C fand in Expositionskassetten mit Verstärkerfolien (Coronex) statt.

Tabelle 2.8.2.1: Zusammensetzung einer Doppelmarkierung mit ^{32}P . Endvolumen: $100\ \mu\text{l}$.

Sonden-DNA	70 ng
dGTP/dTTP-Mix	je $20\ \mu\text{M}$
Oligo-(dNTP) ₆ (50 units/ml)	$10\ \mu\text{l}$
Klenow-Puffer	1 x
Klenow-Enzym	2 units
$\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ -dATP	$40\ \mu\text{Ci}$
$\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ -dCTP	$40\ \mu\text{Ci}$

Hybridisierungslösung

NaCl	0,75	M
NaH ₂ PO ₄	50	mM
EDTA	5	mM
Polyvinylpyrrolidon	0,1	%
BSA, Fraktion V	0,1	%
Ficoll 400	0,1	%
SDS, p.a.	0,2	%

2.8.3 Nicht-radioaktive Hybridisierung mit GENEIMAGE[®]

Zu dem System gehören die zwei Teile „*random prime labelling*“ und „*CDP-StarTM detection module*“ (beides: Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Die Markierung der Sonden-DNA erfolgt durch Einbau von an dUTP gekoppeltem Fluorescein nach der *random priming*-Methode (FEINBERG & VOGELSTEIN, 1983). Die Hybridisierung der Membran und die Detektion des Fluoreszenzsignals erfolgt mit dem „*CDP-StarTM detection module*“. Die Fluoreszenz wurde durch eine alkalische Phosphatase erzeugt, die an einem anti-Fluorescein-Antikörper gekoppelt ist.

Das beschriebene System wurde gemäß Herstellerprotokollen angewandt. Die Hybridisierung erfolgte in einem Drehinkubator der Firma Bachhofer, Reutlingen. Die Dokumentation der Fluoreszenzsignale erfolgte auf Hyperfilm MP (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg).

2.9 Sequenzierung

Zur Sequenzierung von klonierten PCR-Produkten wurde die Kettenabbruchmethode (Didesoxynukleotid-Methode) nach SANGER *et al.* (1977) eingesetzt. Die Sequenzier-PCR-Reaktionen wurden mit den Biochemikalien des Sequenzierkits „*SequiTherm EXCELTM II Long-ReadTM Premix DNA Sequencing Kit-LC[®]*“ (Biozym, Hess. Oldendorf) durchgeführt. Als Sequenzierprimer wurden Primer verwendet, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert waren. Die Detektion dieses Farbstoffs und damit der Sequenz erfolgte an LiCor-Sequen-

ziergeräten der Firma MWG Biotech, Ebersberg in denaturierenden 7 %igen Polyacrylamid-Gelen. Die Auswertung der Gele erfolgte mit der Software „Base ImagIR“ des Geräteherstellers.

2.10 Sequenz-Homologie-Vergleiche

DNA-Sequenzen wurde via Internet mit Sequenz-Datenbanken verglichen. Für diese Vergleiche wurde der BLAST-Algorithmus verwendet (ALTSCHUL *et al.*, 1990; ALTSCHUL *et al.*, 1997). Für die Homologie-Anfragen wurden die folgenden Internet-Adressen genutzt:

<http://www.arabidopsis.org/blast/>

<http://genome-www2.stanford.edu/Arabidopsis>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

2.11 Arbeiten mit der YAC-Bank

Die YAC-Bank (KLEINE, 1993), die für die Isolierung des Nematoden-Resistenzgens *HsI^{pro-1}* (CAI *et al.*, 1997) hergestellt wurde, wurde für die physikalische Kartierung der Region des Schossgens verwendet. Der für die Erstellung der Bank herangezogene Genotyp entspricht dem mütterlichen Elter, der für das Gen *B* spaltenden Kartierungspopulation 960701 (EL MEZAWY, 2001).

Die YAC-Bank besteht aus 12.384 Klonen mit einer durchschnittlichen Insertionsgröße von 130 kb. Dies entspricht einer 2,12-fachen Genomabdeckung der Zuckerrübe. Die Klone sind in 129 Mikrotiterplatten (*96 well*) bei -70°C gelagert.

2.11.1 Anzucht von YAC-Klonen (fest/flüssig)

Die Anzucht auf festem Medium wurde bei der Isolierung von Pool-DNAs angewendet. Zur Untersuchung einzelner Klone wurden diese in Flüssigmedium kultiviert. Die Kultivierung fand stets bei 30°C statt.

2.11.1.1 Anzucht auf Festmedium

Für die Isolierung von Pool-DNAs wurden die Klone getrennt angezogen. Dazu wurden sie mit Hilfe eines 96er Stempels auf Festmedium angeimpft und bei 30°C kultiviert. Vor der Ernte der Zellen wurden drei Selektionsrunden auf Festmedien mit 15 µg/ml Tetracyclin durchgeführt:

1. Anzucht auf YPD-Medium zur „Wiederbelebung“ der bei -70°C gelagerten Klone
2. Anzucht auf DS-Medium ohne Uracil und Tryptophan
3. Anzucht auf YPD-Medium.

Von den letzten Platten wurden die Klone mit Hilfe eines Spatels „abgeschabt“ und der DNA-Isolierung zugeführt.

DS-Medium:

Glucose	2	%
YNB (ohne Aminosäuren)	0,67	%
Arginin, Isoleucin, Histidin, Lysin und Methionin	je 20	µg/ml
Leucin	60	µg/ml
Phenylalanin	50	µg/ml
Valin	150	µg/ml
Tyrosin	30	µg/ml
Adenin	5	µg/ml

Zur Herstellung von Festmedium wurde 2 % Bacto[®] Agar zugegeben.

YPD-Medium:

Glucose	2 %
Bacto [®] Peptone	2 %
Bacto [®] Yeast Extract	1 %

Zur Herstellung von Festmedium wurden 2 % Bacto[®] Agar zugegeben.

2.11.1.2 Anzucht in Flüssigmedium

Für die Isolierung von hochmolekularer oder genomischer YAC-DNA wurden die YAC-Klone in Flüssigkultur angezogen.

Ein YAC wurde in 100 ml DS-Medium (s. 2.11.1.1) in einem 250 ml-Erlenmeyerkolben angeimpft. Dem Medium wurden 15 µg/ml Tetracyclin zugegeben. Die Anzucht erfolgte in einem Schüttelinkubator bei 200 UpM und 30°C für drei bis vier Tage.

Zur Weiterverarbeitung wurden die Zellen pelletiert. Der Niederschlag wurde direkt (hochmolekulare DNA) verwendet oder bei -20°C (genomische DNA) gelagert.

2.11.2 Isolierung genomischer Hefe-DNA

Die verwendete Methode beruht auf der Sphäroplastierung von Hefe-Zellen mittels Lyticase.

Der Zellniederschlag (s. 2.11.1.2) wurde zweimal mit 10 ml 50 mM EDTA, pH 7,5 (NaOH) gewaschen. Die Zellen wurden in 2 ml Sphäroplastierungsmedium resuspendiert. Die Sphäroplastierung erfolgte bei 37°C bis zur Vollständigkeit (1,5-2 h). Die sphäroplastierten Zellen wurden abzentrifugiert (10 Min./1600 x g), in 0,7 ml Lysemedium aufgenommen, stark gemischt und für 15 Min. bei 68°C inkubiert. Das Volumen (~ 1,2 ml) wurde auf zwei Reaktionsgefäße aufgeteilt und mit je 600 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (24:24:1) versetzt. Nach Mischen der Lösung erfolgte die Phasentrennung durch eine 5-minütige Zentrifugation (>14000 x g/4°C). Der wässrige Überstand wurde ein zweites Mal mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert. Zum wässrigen Überstand wurde ein Volumen Isopropanol gegeben. Nach 15 Min. bei Raumtemperatur wurde die DNA durch 10-minütige Zentrifugation bei >14000 x g (4°C) sedimentiert. Die gefällte DNA wurde mit 70 %igem

Ethanol gewaschen und getrocknet. Zum RNA-Abbau (2 h/37°C) wurde der Niederschlag in 300 µl TE-Puffer rückgelöst und mit 2 µl RNase A (10 mg/ml) versetzt. Die DNA wurde erneut mit 600 µl Isopropanol gefällt, mit 70 %igem Ethanol gewaschen und getrocknet. Nach Rücklösen in 300 µl TE-Puffer wurde die DNA mit 2 Volumen Ethanol gefällt. Nach Waschen und Trocknen der DNA wurde diese in 200 µl TE-Puffer rückgelöst.

Lysemedium:

Tris	50	mM (mit 1 M HCl auf pH 7,5 eingestellt)
EDTA	25	mM (mit 1 M NaOH auf pH 7,4 eingestellt)
NaCl	500	mM
β-Mercaptoethanol	3	mM
SDS	1	% (frisch dazugeben)

Sphäroplastierungsmedium:

Sorbitol	1	M
Natriumcitrat	100	mM (mit 1 M HCl auf pH 5,8 eingestellt)
EDTA	10	mM (mit 1 M NaOH auf pH 7,5 eingestellt)
β-Mercaptoethanol	30	mM
Lyticase	6000	units/ml (frisch dazugeben)

2.11.3 Sichten der YAC-Bank

Mit Hilfe von eng gekoppelten AFLP-Markern sollten aus der YAC-Bank diejenigen Klone isoliert werden, mit denen ein *contig* über die Gen *B*-Region erstellt werden sollte.

Zum Sichten der Bank wurden Pools von Klonen verwendet. Der erste Schritt erfolgte mit 96-Klon-Pools (129 Mikrotiterplatten-Pools). Nach der Identifikation eines „positiven“ Mikro-

titerplatten-Pools wurden die DNA-Pools der acht Zeilen und zwölf Spalten eingesetzt. Die Verifikation der Pool-Sichtung erfolgte mit dem YAC-Einzelklon. Zur Identifizierung von YACs wurde eine leicht modifizierte AFLP-Methode angewendet. Die AFLP-Technik wurde für zwei Anwendungen eingesetzt: Sichten der YAC-Bank mit eng gekoppelten AFLP-Markern und AFLP-*fingerprinting* von Einzel-YACs zur *contig*-Erstellung.

2.11.3.1 Sichten der YAC-Bank mittels AFLP

Zur Restriktion/Ligation wurden 200 ng genomische YAC-DNA eingesetzt. Je fünf *units* der Restriktionsenzyme *EcoRI* und *MseI* wurden verwendet. Die Präamplifikation wurde wie in Kapitel 2.6.2 durchgeführt. Für die Amplifikation wurden 5 µl der Präamplifikation mit 10 µl Amplifikationsmix gemischt. Dieser Mix enthielt abweichend zu Kapitel 0 0,3 µl *EcoRI*-Primer (50 ng/µl) und 1 µl *MseI*-Primer (50 ng/µl). Tabelle 2.11.3.1 zeigt das modifizierte PCR-Programm.

Tabelle 2.11.3.1.1: PCR für das Sichten der YAC-Bank mit AFLP-Primern.

Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
94°C	30 Sek.	1
94°C	30 Sek.	
65°C	30 Sek.	13
72°C	60 Sek.	
94°C	30 Sek.	
56°C	30 Sek.	23
72°C	60 Sek.	
72°C	300 Sek.	1
4°C	∞	

2.11.4 AFLP-fingerprinting von YACs

Zur Restriktion/Ligation wurden 100 ng genomischer YAC-DNA eingesetzt. Die Präamplifikation wurde analog Kapitel 0 durchgeführt. Die Präamplifikation wurde 1:50 mit $T_{0,1}E$ -Puffer verdünnt. Zur Amplifikation wurden 2,5 μ l der verdünnten Präamplifikation eingesetzt. Das PCR-Programm entsprach dem in Tabelle 2.11.3.1. Die eingesetzten Primer hatten je eine selektive Base.

2.11.5 Isolierung von YAC-Endklonen

Die YAC-Enden wurden mittels inverser PCR (IPCR) amplifiziert und kloniert (KLEINE *et al.*, 1997). Diese Methode besteht aus Restriktion, Religation und anschließender Amplifikation mit YAC-Arm spezifischen Primern (Tabelle 2.11.5.1). Abbildung 2.11.5.1 zeigt eine schematische Darstellung eines auf pYAC4 basierenden YACs.

Ein bis zwei Mikrogramm der genomischen Einzel-YAC-DNA wurden mit 20 *units* *Hae*III oder *Taq*I restringiert. Nach 90-minütiger Inkubation bei 37°C wurde der Ansatz mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (24:24:1) extrahiert und die DNA mit einem Volumen Isopropanol gefällt. Die durch Zentrifugation sedimentierte DNA wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen und getrocknet. Die DNA wurde in 50 μ l dest. Wasser rückgelöst. Zur Religation wurden 5 μ l der restringierten DNA mit 10 *units* T4-DNA-Ligase in 1 x Ligase-Puffer versetzt und über Nacht bei 14°C ligiert. Zwei Mikroliter des Religationsansatzes wurden für die inverse PCR eingesetzt. Zur Amplifizierung wurden spezifische Primer verwendet, die homolog zu YAC-Arm-Sequenzen (Tabelle 2.11.5.1) waren. Ein PCR-Ansatz (20 μ l) enthielt neben 2 μ l des Religationsansatzes 1 x *Taq*-DNA-Polymerase-Puffer, je 1 μ M der Primer und 0,5 *unit* *Taq*-DNA-Polymerase. Das Programm der inversen PCR ist in Tabelle 2.11.5.2 aufgezeigt.

Tabelle 2.11.5.1: Verwendete YAC-Arm spezifische Primer.

YAC-Arm	Primer	Sequenz (5'→3')
links	LF	AAG TAC TCT CGG TAG CCA AG
links	LR1	GTG TGG TCG CCA TGA TCG CG
links	LR3	TCA GAG TGA AAT TTA TAC TAA ACG A
rechts	RF	AGT CGA ACG CCC GAT CTC AA
rechts	RR2	AAG GAT CCT CTA CGC CGG AC

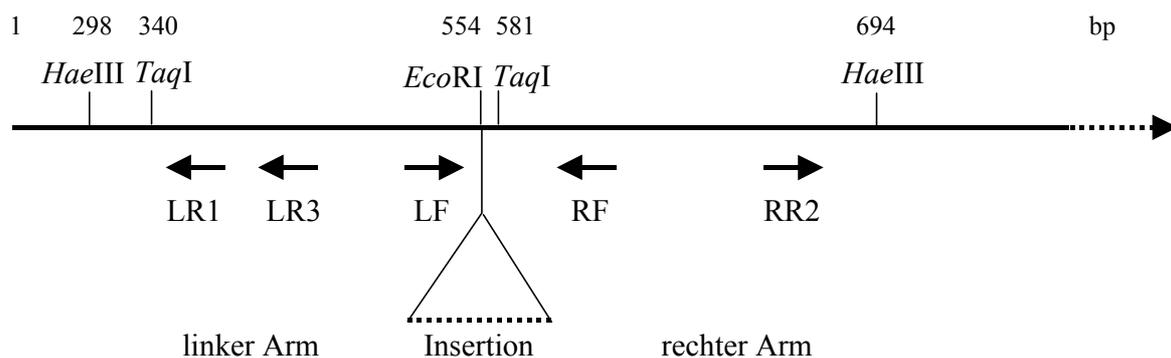


Abbildung 2.11.5.1: Schematische Darstellung von pYAC4. Die für die Klonierung der YAC-Enden verwendeten Restriktionsschnittstellen *HaeIII* und *TaqI* und Primer sind eingezeichnet. Die YAC-Insertionen sind in die *EcoRI*-Schnittstelle kloniert. Die physikalischen Distanzen sind nicht maßstabsgerecht dargestellt.

Die Analyse der Produkte erfolgte auf einem Agarose-Gel. Die Produktbanden wurden ausgeschnitten und nach Herstellerangaben mit dem Sephaglas™ BandPrep Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) aufgereinigt. Die aufgereinigten Fragmente wurden nach Herstellerprotokoll in den Vektor pGEM-T (Promega, Mannheim) kloniert. Die Transfor-

mation der Ligation erfolgte durch Elektroporation in kompetente *E. coli* DH10B-Zellen. Die Plasmid-DNA von Transformanden wurden isoliert (s. 2.4.2.2) und sequenziert (s. 2.9).

Tabelle 2.11.5.2: Programm für die inverse PCR.

Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
94°C	3 Min.	1
94°C	1 Min.	
<i>annealing</i> -Temperatur	2 Min.	32
72°C	2 Min.	
72°C	10 Min.	1
4°C	∞	

2.11.6 *Chromosome walking*

Die Methode des *chromosome walkings* (BENDER *et al.*, 1983) dient zur Identifizierung von DNA, die mit einem genomischen DNA-Klon überlappt und benachbart ist. Dabei kommen die Endsequenzen des bekannten genomischen Klons zum Tragen. Diese Methodik wurde in dieser Arbeit zum Auffüllen von *contig*-Lücken verwendet.

Für das *chromosome walking* wurden Primer von den klonierten und sequenzierten YAC-Enden (s. 2.11.5) abgeleitet. Die Überprüfung der Primer erfolgte durch eine PCR. Als Kontroll-DNA diente DNA der Einzel-YACs, des entsprechenden YAC-Endklons und genomische DNA von Zuckerrüben (*BB*, *bb*). Verliefe der Test positiv, wurde die PCR mit den Mikrotiterplatten-Pools (s. 2.11.3.1) wiederholt.

Nach der Identifizierung eines Mikrotiterplatten-Pools wurde die PCR mit der DNA der Zeilen- und Spalten-Pools (s. 2.11.3.1) der entsprechenden Mikrotiterplatte wiederholt. Die Verifikation des Einzel-YACs erfolgte als Einzelklon.

2.11.7 *Contig*-Analyse

Zwei Strategien zur Erstellung eines *contigs* wurden verwendet: AFLP-*fingerprinting* und *chromosome walking*.

Die Methode des AFLP-*fingerprintings* wurde in Kapitel 2.11.4 beschrieben. Die Bandenmuster wurden verglichen. Identische Banden deuten auf überlappende Regionen hin.

Für das *chromosome walking* (s. 2.11.6) wurden die Primer der YAC-Enden auf den Einzel-YAC-DNAs getestet. YACs wurden als überlappend angesehen, wenn ein Primerpaar bei der PCR in mehr als einem YAC ein Amplifikat bildete.

2.11.8 Isolierung von hochmolekularer genomischer DNA aus YAC-Klonen

Zur Bestimmung der Insertionsgrößen wurde hochmolekulare DNA aus den YAC-Klonen isoliert.

Die Hefe-Zellen einer Flüssigkultur wurden pelletiert und zweimal mit 10 ml Waschlösung I gewaschen. Die Zellen wurden in Sphäroplastierungsmedium (s. 2.11.2), das nur 1000 *units* Lyticase/ml enthielt, resuspendiert. Die Mischung wurde auf 42°C temperiert und mit einem Volumen auf 42°C temperierter 1,5 %iger InCert™-Agarose (Biozym, Hess. Oldendorf) gemischt. Zum Erhärten wurde die Mischung in Förmchen (200 µl) gegossen und bei 4°C inkubiert. Zum Zellwandabbau wurden die Agaroseblöcke in SCE-Lösung über Nacht bei 37°C inkubiert. Ein anschließender Proteinase K-Abbau erfolgte über Nacht in ESP-Lösung bei 50°C. Vor der Auftrennung auf einem Pulsfeldgel wurden die Blöcke mit 1x TE-Puffer gewaschen.

Waschlösung I:

EDTA 50 mM (mit 1 M NaOH auf pH 7,5 eingestellt)

β-Mercaptoethanol 30 mM

SCE-Lösung:

Sorbitol	1 M
Natriumcitrat	100 mM (mit 1 M HCl auf pH 7,4 eingestellt)
EDTA	10 mM (mit 1 M NaOH auf pH 7,5 eingestellt)
β-Mercaptoethanol	30 μM

ESP-Lösung:

EDTA	0,5 M, pH 9-9,5 (NaOH)
N-Lauroylsarkosinat	1 %
Proteinase K	1 mg/ml

2.12 BAC-Klonierung

In diesem Abschnitt ist nur die erfolgreich verwendete Strategie zur BAC-Klonierung beschrieben. Grundlage für die Klonierung großer DNA-Fragmente ist hochmolekulare DNA (**high molecular weight DNA**, HMW-DNA; Megabasen-DNA). Für die Erzeugung von BACs wurden DNA-Fragmente von ca. 100-200 kb in den mit *Hind*III restringierten pBeloBAC11-Vektor kloniert. Die Transformation erfolgte mittels Elektroporation in *E. coli* DH10B. Abbildung 2.12.1 gibt eine Übersicht über die Teilschritte der BAC-Klonierung wieder.

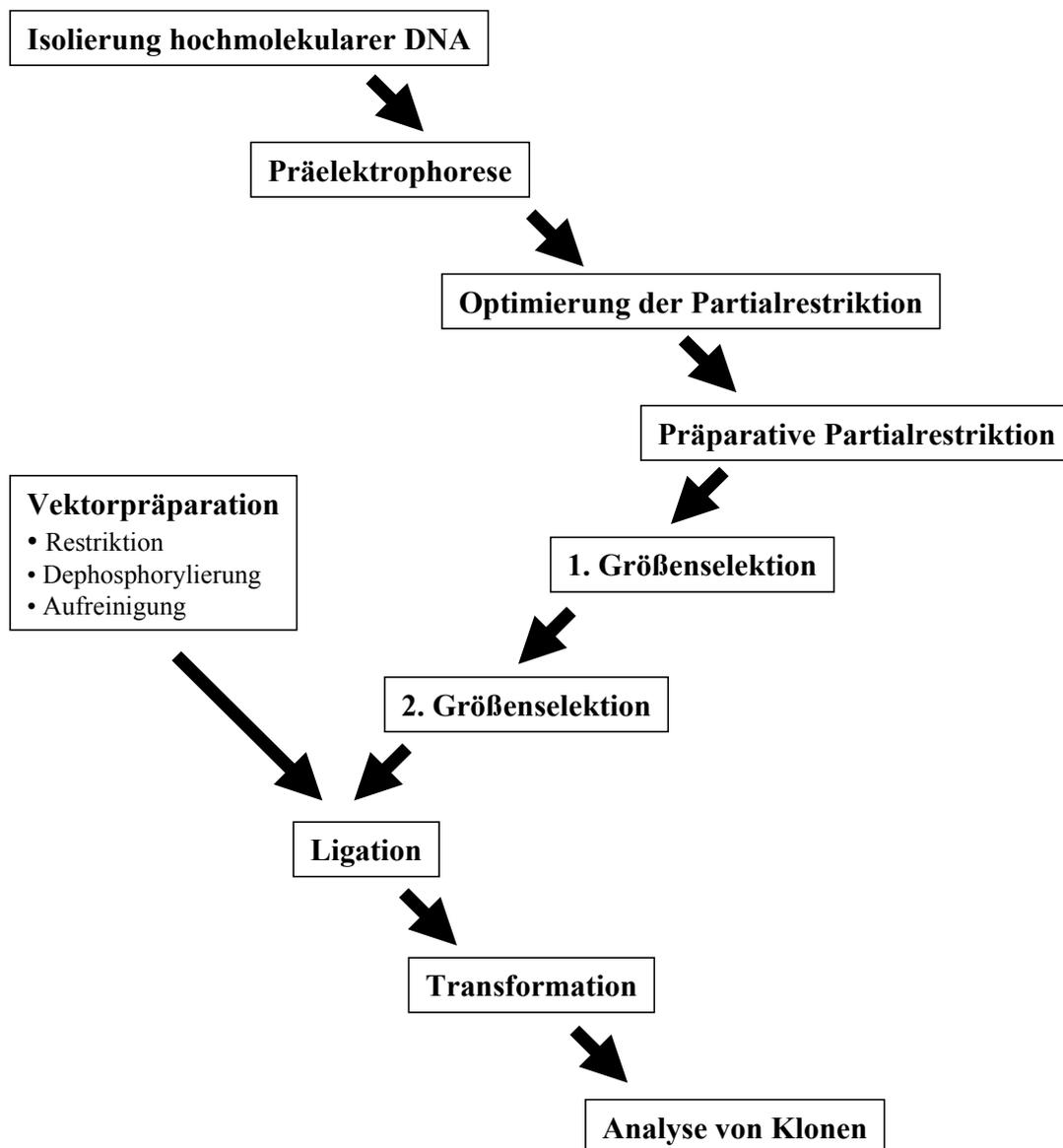


Abbildung 2.12.1: Übersicht über die Schritte zur BAC-Klonierung.

2.12.1 Isolierung hochmolekularer DNA aus Pflanzen

Für die Klonierung von BACs wurde DNA aus der Linie KWS2320 verwendet. Als Material wurden junge Blätter von höchstens 12 Wochen alten Pflanzen verwendet. Vor der Ernte des Blattmaterials wurden die Pflanzen zwei Tage dunkel gestellt. Die geernteten Blätter wurden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -70°C gelagert. Zur DNA-Isolierung wurde die Methode von BENDAHMANE *et al.* (1997) leicht modifiziert angewendet.

Etwa 10 g schockgefrorenes Blattmaterial wurde mit Hilfe eines Mörsers und flüssigem Stickstoffs zu einem feinen Pulver zerkleinert. Dieses wurde in 100 ml eiskaltem Kern-Extraktionspuffer durch Rühren (10 Min.) resuspendiert. Die Suspension wurde durch Planktonnetze der Maschenweiten 280 µm, 90 µm, 55 µm und 20 µm (Hydro-Bios, Kiel) filtriert. Das Filtrat wurde mit 1/20 Volumen Kern-Extraktionspuffer, der 10 % Triton X-100 enthielt, versetzt und vorsichtig gemischt. Durch eine Zentrifugation (4°C, 10 Min.) bei 1200 x g wurden die Zellkerne sedimentiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt und der Niederschlag vorsichtig auf Eis in wenig 1x TE-Puffer gelöst. Die Suspension wurde auf 45°C temperiert und mit einem Volumen 1,4 % InCert™-Agarose (Biozym, Hess. Oldendorf), die mit 1x TE-Puffer hergestellt und auf 45°C temperiert wurde, versetzt und vorsichtig zur gleichmäßigen Suspension vermischt. Die Mischung wurde in 200 µl-Formen (BioRad, München) gegossen. Die erstarrten Lysatblöcke wurden für 36-48 h in Lyse-Puffer bei 50°C inkubiert. Der Lysepuffer wurde nach 18-24 h erneuert. Nach der Lyse wurden die Agarose-blöcke zweimal für je 2 h bei Raumtemperatur in 40 µg/ml PMSF (Phenylmethylsulfonyl-fluorid) enthaltendem TE-Puffer gewaschen (Überkopfschüttler). Die Agaroseblöcke wurden mit 1x TE-Puffer gewaschen und in 0,5 M EDTA-Lösung bei 4°C gelagert.

Kern-Extraktionspuffer:

Tris	10	mM (mit 1 M HCl auf pH 9,5 eingestellt)
EDTA	10	mM
KCl	100	mM
Saccharose	0,5	M
frisch zugeben:		
Spermidin-HCl	4	mM
Spermin	1	mM
β-Mercaptoethanol	0,1	%

Lysepuffer:

N-Lauroylsarkosinat	1	%
EDTA	0,4	M (mit 1 M NaOH auf pH 8,5 eingestellt)
Proteinase K	1	mg/ml
Na ₂ S ₂ O ₅	3,8	mg/ml

0,5 M EDTA-Lösung

EDTA 0,5 M (mit 1 M NaOH auf pH 8 eingestellt)

2.12.2 Präelektrophorese

Eine Präelektrophorese diente zur Abtrennung kleiner DNA-Moleküle aus den Agaroseblöcken.

Für die Präelektrophorese wurden die in 0,5 M EDTA gelagerten Blöcke mit 0,5 x TBE (PFGE-Laufpuffer) äquilibriert (zweimal 1 h). Die Agaroseblöcke wurden in ein 1 %iges Agarose-Gel (SeaKem[®] LE, Biozym, Hess. Oldendorf) eingegossen. Das erstarrte Gel wurde in der Pulsfeldgelapparatur (CHEF DR[®] II, BioRad, München) auf 4°C vorgekühlt. Als Laufbedingungen wurden 200 V Spannung, eine konstante Pulszeit von 60 Sek. und eine Laufzeit von 2-2,5 h gewählt. Die Laufzeit hing von der DNA-Präparation ab und wurde in einem Vorversuch bestimmt. Nach der Elektrophorese wurden die Agaroseblöcke wieder aus dem Gel entfernt und bis zur weiteren Verwendung in 0,5 M EDTA-Lösung (s. 2.12.1) bei 4°C gelagert.

2.12.3 Partialrestriktion mit *Hind*III

Die hochmolekulare DNA wurde in Fragmente von etwa 100-250 kb Größe geschnitten. Die optimalen Bedingungen für die Partialrestriktion wurden für jede DNA-Isolierung neu bestimmt.

2.12.3.1 Optimierung der Partialrestriktion

Vor der Restriktion wurden die Agaroseblöcke zweimal für je 1 h in 1x TE-Puffer äquilibriert (4°C). Durch zweimalige Inkubation (je 1 h) der Blöcke bzw. Teilblöcke in Restriktionspuffer (4°C) wurden diese umgepuffert. Je Ansatz wurden etwa 50 µl-Agaroseblockstücke für die Testrestriktion verwendet. Für den Test wurden je 50 µl-Block 0 *unit*, 7,5 *units* bzw. 15 *units* *Hind*III (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg,) in 500 µl Restriktionspuffer eingesetzt. Nach einer einstündigen Inkubation mit Enzym auf Eis fand die Restriktion für eine Stunde bei 37°C statt. Zum Stoppen der Reaktion wurde die Reaktionslösung entfernt und durch kalte (4°C) 0,5 M EDTA-Lösung (s. 2.12.1) ersetzt. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Proben durch Pulsfeldgelelektrophorese (s. 2.7) aufgetrennt. Als Laufbedingungen (CHEF DR[®] II, BioRad, München) wurden 200 V Spannung, ein Pulszeitgradient von 60-90 Sek. und eine Laufzeit von 16 h eingestellt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht analysiert.

Als „optimale Restriktionsbedingung“ galt die Restriktion, die dazu führte, dass der Großteil der DNA in einem Größenbereich von etwa 100-250 kb lag.

Restriktionspuffer:

Puffer M (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)	1 x
Rinderserumalbumin	100 µg/ml
Spermidin-HCl	8 mM
Dithiotreitol	1 mM

2.12.3.2 Präparative Partialrestriktion

Für die eigentliche Klonierung wurde die Partialrestriktion in mehrfachen Ansätzen mit der „optimalen“ Enzymmenge wiederholt.

2.12.4 Größenselektion

Zur Anreicherung von mittleren und großen DNA-Fragmenten wurde eine doppelte Größenselektion mittels Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE, s. 2.7) durchgeführt.

Die Agaroseblöcke wurden im Laufpuffer (0,5 x TBE) äquilibriert und in ein Pulsfeldgel (1 % SeaKem[®] LE, Biozym, Hess. Oldendorf) eingegossen. Dazu wurden die Blöcke an dem oberen Rand der Gelgießapparatur fixiert. Als Größenmarker dienten Hefechromosomen und der *low range*-PFG-Marker (New England Biolabs, Frankfurt/M). Vor der Elektrophorese wurde das Gel vorgekühlt (4°C). Die Laufbedingungen von 200 V Spannung und ein Pulszeitgradient von 60-90 Sek. wurden für 18 h angelegt.

Nach der Elektrophorese wurden die Markerspuren vom Gel abgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. An den gefärbten Randstreifen wurden Markierungen für 50 kb, 100 kb, 150 kb, 200 kb und 250 kb angebracht. Mit Hilfe dieser Markierungen wurden aus dem verbleibenden, nicht-gefärbten Gel (Partialrestriktion) die Größenbereiche 50-100 kb, 100-150 kb, 150-200 kb und 200-250 kb ausgeschnitten.

Zur zweiten Größenselektion wurden diese Agarosestreifen erneut in ein Pulsfeldgel (1 %) eingegossen. Als Agarose wurde SeaPlaque[®] GTG (*low melt*-Agarose, Biozym, Hess. Oldendorf) verwendet. Die Laufbedingungen waren ein Pulszeitgradient von 5-15 Sek., eine Spannung von 150 V und eine Laufzeit von 10 h.

Nach der Elektrophorese wurden die Ränder (inkl. Ränder der eingegossenen Bereiche) des Gels abgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Unter UV-Licht wurde die Kompressionsbande (> 100 kb) markiert. Die Kompressionsbande zeigte sich als schmaler Streifen (2-3 mm Dicke). Kleinere Fragmente lagen in einem Bereich unterhalb dieser Kompressionsbande und zeigten sich als unscharfer Bereich. Die Kompressionsbande des ungefärbten Gels wurde ausgeschnitten und für die Klonierung eingesetzt.

Die ausgeschnittenen Agarosestreifen wurde für 2-3 h in TE-Puffer äquilibriert (4°C). Nach Entfernen des TE-Puffers wurden die *low melt*-Agarosestreifen bei 70°C vollständig aufgeschmolzen (2-3 Min.). Nach Abkühlung auf 45°C (2 Min.) wurde 1 *unit* GELase je 100 µl

geschmolzener Agarose zugegeben. Nach einer Stunde bei 45°C war die Agarose verflüssigt. Die DNA-Konzentration wurde mittels Gelelektrophorese bestimmt.

2.12.5 Vektorpräparation

Für die Zuckerrüben-BAC-Bank wurde der Vektor pBeloBAC11 (KIM *et al.*, 1996) mit *Hind*III restringiert.

2.12.5.1 Plasmid-DNA-Isolation

Die Isolation der Plasmid-DNA erfolgte mit dem von Qiagen (Hilden) vertriebenen Kit „QIAfilter Plasmid Maxi Kit“. Für die Isolation der DNA wurde eine 1 l-Übernachtskultur eines *E. coli* DH10B-Klons verwendet, der den Vektor enthielt. Die Durchführung der Isolation folgte dem Protokoll von MOZO *et al.* (1998). Die getrocknete DNA wurde in 200 µl dest. Wasser rückgelöst.

2.12.5.2 *Plasmid-safe*TM-DNase-Behandlung

Zur Entfernung von linearer DNA, die in der DNA-Präparation enthalten ist, wurde die isolierte DNA mit der ATP-abhängigen *Plasmid-safe*TM-DNase (Biozym, Hess. Oldendorf) behandelt, die selektiv lineare DNA abbaut, aber zirkuläre DNA nicht angreift.

In Anlehnung an MOZO *et al.* (1998) wurden 170 µl der Vektor-DNA mit 8,4 µl 25 mM ATP, 1 x *Plasmid-safe*TM-DNase-Puffer und 100 *units Plasmid-safe*TM-DNase (Biozym, Hess. Oldendorf) behandelt. Nach einer Übernachts-Inkubation bei 37°C wurde der Ansatz mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (24:24:1) extrahiert, die DNA gefällt und in 100 µl dest. Wasser rückgelöst.

2.12.5.3 Restriktion mit *Hind*III

Pro 20 µl-Ansatz wurde 1 µg pBeloBAC11 mit 30 *units Hind*III in 1 x Puffer M (beides: Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) bei 37°C geschnitten. Die vollständige Linearisierung des Plasmids (3-4 h) wurde auf einem Agarose-Gel kontrolliert. Der Ansatz wurde mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (24:24:1) extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit 1/10 Volumen 3 M Kaliumacetat-Puffer und 2,5 Volumen Ethanol versetzt, gemischt und für 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die DNA wurde durch 10-minütige

Zentrifugation bei $>14000 \times g$ (Raumtemperatur) gefällt. Die mit 70 %igem Ethanol gewaschene DNA wurde luftgetrocknet und in 20 μl dest. Wasser rückgelöst.

3 M Kaliumacetat-Puffer:

Kaliumacetat/Essigsäure-Puffer (pH 4,5) 3 M

2.12.5.4 Dephosphorylierung

Zur Dephosphorylierung wurden 8 μl des mit *Hind*III restringierten Vektors (ca. 0,4 μg ; s. 2.12.5.3) mit 1 *unit* HKTM thermolabile Phosphatase (Biozym, Hess. Oldendorf) dephosphoryliert. Ein 20 μl -Ansatz enthielt neben der Vektor-DNA und der Phosphatase 2 μl 10 x TA-Puffer und 1 μl 100 mM CaCl_2 (beides: Biozym, Hess. Oldendorf). Nach einstündiger Inkubation bei 30°C wurde die Phosphatase durch 15-minütige Inkubation bei 65°C inaktiviert.

2.12.5.5 Aufreinigung des präparierten Vektors

Der *Hind*III restringierte und dephosphorylierte Vektor wurde über ein Agarose-Gel aufgereinigt. Nach der Inaktivierung der HKTM thermolabilen Phosphatase wurde der Dephosphorylierungsansatz auf ein 1 %iges *low melt*-Agarose-Gel (NuSieve[®] GTG, Biozym, Hess. Oldendorf) geladen. Nach der Auftrennung wurde die Bande des linearisierten Vektors unter UV-Licht aus dem Ethidiumbromid-gefärbten Gel ausgeschnitten. Das Agarosestück wurde bei 68°C aufgeschmolzen (3 Min.) und auf 45°C temperiert. Der Abbau der Agarose (1 h/45°C) erfolgte mit einem *unit* GELaseTM (Biozym, Hess. Oldendorf) je 100 μl Agarose. Der präparierte Vektor wurde bei -20°C gelagert.

2.12.5.6 Qualität der Vektorpräparation

Zur Prüfung der Vektorpräparation wurde der *Hind*III restringierte und dephosphorylierte Vektor religiert. In 100 μl wurden über Nacht (16°C) 5-10 ng präparierter Vektor mit 400 *units* T4-DNA-Ligase (New England Biolabs, Frankfurt/M) in 1x Ligase-Puffer religiert. Vor der Transformation wurde die Ligation entsalzt (s. 2.12.7). Zum Test wurden 2 μl des

Ligationsansatzes transformiert (s. 2.12.8). Die Anzahl gewachsenen Klone wurde zur Abschätzung der Qualität der Präparation herangezogen.

2.12.6 Ligation

Mit jeder größenfraktionierten DNA wurde eine Ligation durchgeführt. Fünf bis zehn Nanogramm des präparierten Vektors (1-3 μ l) und 50-100 ng (10-20 μ l) der größenfraktionierten Zuckerrüben-DNA wurden vorsichtig gemischt. Der 100 μ l-Ansatz wurde in 1 x Ligase-Puffer mit 400 *units* T4-DNA-Ligase (New England Biolabs, Frankfurt/M) über Nacht bei 14-16°C inkubiert.

2.12.7 Entsalzen der Ligationen

Die Entsalzung der Ligationen wurde in Form einer Dialyse durchgeführt. Als „Dialysemembran“ wurden Filterscheiben mit einer Porengröße von 25 nm (VSWP02500, Millipore, Eschborn) verwendet. Die Ligationen wurde auf Filterscheiben pipettiert, die in einer Petrischale auf 0,5 x TE-Puffer schwammen. Nach einer Stunde bei Raumtemperatur wurde die auf dem Filter verbleibende Lösung (ca. 60 μ l) in ein Reaktionsgefäß überführt und bis zur Transformation bei 4°C gelagert.

2.12.8 Transformation

Zur Transformation wurden kompetente Zellen von Life Technologies, Karlsruhe (ElektroMAX DH10B™ Cells) eingesetzt. Diese wurden bei -70°C gelagert. Vor der Verwendung wurden die kompetenten Zellen zum Auftauen für mindestens 30 Min. auf Eis inkubiert.

Zur Elektroporation wurden das Gerät „Gene Pulser® II“ und Küvetten mit 2 mm-Elektrodenabstand (beides: BioRad, München) verwendet. Als Geräteeinstellungen wurden ein Widerstand von 100 Ω , eine Kapazität von 25 μ F und eine Feldstärke von 12,5 kV/cm (2,5 kV/2 mm) gewählt (SHENG *et al.*, 1995, MOZO *et al.*, 1998).

Für eine Testtransformation wurden 2 μ l Ligationsansatz mit 10-12,5 μ l der kompetenten Zellen vorsichtig gemischt. Bei Großansätzen wurden bis zu 35 μ l Ligation zu 100 μ l kompetenten Zellen gegeben. Nach einer kurzen Inkubation (1 Min.) auf Eis wurde die

Mischung in die Elektroporationsküvette überführt. Nach der erfolgten Elektroporation bei 0-4°C wurden die Zellen in 1-1,5 ml SOC-Medium resuspendiert und zur phänotypischen Expression für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Transformationslösung wurde auf LB-Agar-Platten (SAMBROOK *et al.*, 1989) mit 12,5 µg/ml Chloramphenicol, 64 µg/ml X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid) und 32 µg/ml IPTG (1-Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid) ausplattiert und für 16-24 h bei 37°C inkubiert. Zur Verstärkung der Blau-Färbung der Klone wurden die Platten im Anschluss bei 4°C gelagert.

SOC-Medium:

Bacto® Trypton	2	%
Bacto® Hefeextrakt	0,5	%
NaCl	10	mM
KCl	2,5	mM
Magnesiumchlorid	10	mM
Magnesiumsulphat	10	mM
Glucose	20	mM

2.12.9 Analyse der Klone

Zur Qualitätsbestimmung der Transformationen bzw. der Ligationen wurde die Anzahl der weißen und blauen Kolonien bestimmt. Über deren Zahl wurde die gesamt zu erwartende Klonzahl je Ligation abgeschätzt.

Exemplarisch wurde von einigen weißen Klonen die Plasmid-DNA isoliert und mit *NotI* restringiert. Die Insertionsgrößen der BACs wurden auf einem Pulsfeldgel bestimmt.

2.12.9.1 Mini-DNA-Isolation

Zur Isolierung der DNA wurde eine auf der alkalischen Lyse basierende Standard-Schnellmethode verwendet.

Die Zellen von 2-3 ml einer Übernachtskultur wurden durch Zentrifugation (2 Min./ >14000 x g) sedimentiert. Der Zelleniederschlag wurde in 150 µl Lösung I vollständig resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Lösung II wurden die Ansätze durch Invertieren (8 x) gemischt und für 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 150 µl 3 M Kaliumacetat-Puffer (s. 2.12.5.3), vorsichtiges Mischen und sofortiges Inkubieren auf Eis (> 15 Min.) wurde die genomische DNA ausgefällt. Die Abtrennung der ausgefallenen genomischen DNA erfolgte durch 10-minütige Zentrifugation mit > 14000 x g (Raumtemperatur). Zur Abtrennung der Proteine wurden die Ansätze mit 400 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (24:24:1) extrahiert. Zur Fällung der Plasmid-DNA wurden 375 µl der wässrigen Phase mit 750 µl Ethanol (-20°C) vermischt. Durch 10-minütige Zentrifugation bei > 14000 x g (4°C) wurde die DNA sedimentiert. Der Niederschlag wurde mit 70 % igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 µl dest. Wasser rückgelöst.

Lösung I:

Glucose	50 mM
EDTA	10 mM
Tris	25 mM (mit 1 M HCl auf pH 8,0 eingestellt)
Lysozym	3 mg/ml

Lösung II:

SDS	0,1 %
NaOH	0,2 M

2.12.9.2 Insertionsgrößenbestimmung durch *NotI*-Restriktion

Zur Bestimmung der Insertionen der BACs wurden diese mit *NotI* restringiert. Nach Auftrennung der Restriktion auf einem Pulsfeldgel wurden die Insertionsgrößen anhand von Größemarkern abgeschätzt.

Zur Restriktion mit *NotI* wurden 10 µl der nach 2.12.9.1 isolierten DNA mit 5 *units NotI* (New England Biolabs, Frankfurt/M) restringiert. Die Ansätze wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Auftrennung der Fragmente wurde eine Pulsfeldgelelektrophorese (s. 2.7) mit den Parametern 200 V Spannung, Pulszeitgradient von 5-15 Sek. und 16 h Laufzeit in einer CHEF DR[®] II-Anlage (BioRad, München) durchgeführt. Das Pulsfeldgel wurde mit Ethidiumbromid gefärbt und die Insertionsgrößen anhand des *low range*-PFG-Markers (New England Biolabs, Frankfurt/M) abgeschätzt.

2.13 Picken und Lagern der BAC-Klone

Zum Lagern der BAC-Bank wurden die BACs in 384 *well*-Mikrotiterplatten (Genetix, Christchurch, UK) überimpft. Das Picken mit dem Roboter *Q Pix Colony Picker* (Genetix, Christchurch, UK) wurde unter der Leitung von Frau Dr. Dagmar Schmidt am IPK, Gatersleben durchgeführt.

Zur Lagerung wurden in jede Kavität der Mikrotiterplatte 50 µl Lagermedium (*freezing medium*, MOZO *et al.*, 1998) mit 12,5 µg/ml Chloramphenicol pipettiert. Nach Animpfen der Klone wurden diese über Nacht bei 37°C angezogen. Die Mikrotiterplatten wurden mit einer Klebefolie (*Adhesive Plate Seals*, Advanced Biotechnologies, Epson, UK) verschlossen und bei -70°C gelagert.

2.14 Herstellung von und Hybridisierung auf *high density*-Filter

Zur effektiven Sichtung der BAC-Bank wurden *high density*-Filter hergestellt. Diese wurden mit dem Spottroboter *BioGrid* von Biorobotics, Cambridge, UK erzeugt.

Auf einen Filter (22 cm x 22 cm) wurden 48 384 *well*-Mikrotiterplatten im 4x4 *double offset* (Abbildung 2.14.1) gespottet. Der Filter wurde auf LB-Agar-Platten (SAMBROOK *et al.*, 1989) mit 12,5 µg/ml Chloramphenicol vorgelegt und die Klone auf diesen gestempelt. Die Klone wurden über Nacht bei 37°C angezogen. Die Filter wurden für 30-45 Min. bei 80°C gebacken. Die Hybridisierung erfolgte nach dem Protokoll aus Kapitel 2.8.2. Die Detektion erfolgte mit dem Phosphor-Imager BAS-1000 (raytest, Straubenhardt).

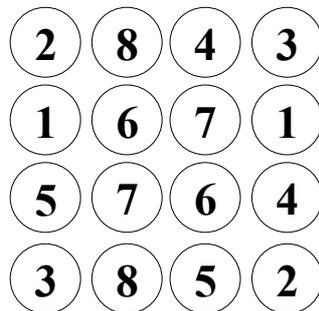


Abbildung 2.14.1: Für das Herstellen der *high density*-Filter verwendetes 4x4 *double offset*-Muster.

2.15 Charakterisierung der BAC-Bank

Zur Charakterisierung der BAC-Bank wurden folgende Parameter der Bank bestimmt:

1. Anteil nicht-wachsender Klone
2. Anteil Klone ohne Insertion
3. Anteil der Klone mit mitochondrialer DNA
4. Anteil der Klone mit plastidärer DNA
5. Anteil der Klone mit ribosomaler DNA
6. Durchschnittliche Insertionsgröße

Zur Bestimmung von 1. und 2. wurden die Klone von 8 *384 well*-Mikrotiterplatten (N=3072) der BAC-Bank auf LB-Indikatorplatten (s. 2.12.8) angezogen. Die nicht-wachsenden und die blauen Klone wurden ausgezählt. Zur Bestimmung der durchschnittlichen Insertionsgröße wurden zufällig ausgewählte Klone nach Kapitel 2.12.9 analysiert. Die DNA-Herkunft (Mitochondrien, Plastiden, rDNA) wurde durch radioaktive SOUTHERN-Hybridisierung (s. 2.8.2) auf Filtern mit 3072 Klonen mit den Sonden aus Tabelle 2.15.1 ermittelt.

Tabelle 2.15.1: Sonden für die Charakterisierung der BAC-Bank.

Name	Herkunft	Literatur	Nr. Klonbank
pXX1.6	Tabak-Chloroplasten	SHINOZAKI <i>et al.</i> (1986)	2421
205-498Rsa	Gerste-Plastiden	KRUPINSKA (1992)	2422
cox I	<i>Oenothera</i> -Mitochondrien	HIESEL <i>et al.</i> (1987)	2423

3 Ergebnisse

3.1 Sichten der YAC-Bank

Die YAC-Bank wurde mit AFLP-Markern und YAC-Enden (*chromosome walking*) gesichtet. Zur Charakterisierung der isolierten YACs wurden die Insertionsgrößen mittels Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) bestimmt.

3.1.1 Sichten der YAC-Bank mit AFLP-Markern

Zum Sichten der YAC-Bank wurden 20 AFLP-Marker verwendet, die für das zweijährige Allel (*b*) des Schossgens spezifisch waren. Die Marker wurden mit Hilfe einer *bulked segregant*-Analyse (BSA) identifiziert, bei der homozygot einjährige (*BB*) mit homozygot zweijährigen (*bb*) Zuckerrüben verglichen wurden. Zum Teil wurden die Marker für die Feinkartierung des Schossgens eingesetzt (Abbildung 3.1.1.1, EL MEZAWY, 2001). Die verwendeten 17 AFLP-Primerkombinationen sind in Tabelle 3.1.1.1 aufgelistet. Neun weitere *b*-spezifische AFLP-Marker konnten nicht für das Sichten verwendet werden, da die Amplifikate durch entsprechende AFLP-Fragmente der Hefe-DNA überlagert wurden.

Zum Sichten der YAC-Bank wurde die DNA-Menge, die Primer-Konzentration, die Verdünnung nach der Präamplifikation und das PCR-Programm des AFLP-Protokolls variiert, so dass DNA von Mikrotiterplatten-Pools (je 96 Klone) analysiert werden konnten. Das optimierte Protokoll ist in Kapitel 2.11.3.1 beschrieben.

Durch die 17 AFLP-Primerkombinationen bzw. für die 20 AFLP-Marker wurden insgesamt 29 Mikrotiterplatten-Pools identifiziert. Für fünf AFLP-Marker wurden keine positiven Mikrotiterplatten-Pools gefunden. Die verbleibenden 15 Marker identifizierten jeweils zwischen einem und vier positive Pools.

Von den 29 positiven Mikrotiterplatten-Pools wurden nur neun mit Hilfe der jeweiligen acht Zeilen- und zwölf Spalten-Pools bestätigt. Diese wurden auch mit Einzel-YAC-DNA bestätigt. Die erfolgreiche Identifikation eines YAC-Klons durch AFLP-Analysen ist beispielhaft in Abbildung 3.1.1.2 gezeigt.

Tabelle 3.1.1.1: Zum Sichten der YAC-Bank verwendete AFLP-Primerkombinationen.

<i>EcoRI</i> -Primer	<i>MseI</i> -Primer	Fragmentgröße in bp	Kodierter Markername (EL MEZAWY, 2001)
<i>EcoRI</i> -AAA	<i>MseI</i> -CGA	90	p15_b090
<i>EcoRI</i> -AAC	<i>MseI</i> -CGT	260	p12_b260
<i>EcoRI</i> -AAC	<i>MseI</i> -CTA	179	p13_b179
<i>EcoRI</i> -AAG	<i>MseI</i> -CCC	160	
<i>EcoRI</i> -AAT	<i>MseI</i> -CCA	278	
<i>EcoRI</i> -AAT	<i>MseI</i> -CCG	84	p16_b084
<i>EcoRI</i> -AAT	<i>MseI</i> -CGT	127	
<i>EcoRI</i> -ACG	<i>MseI</i> -CGG	165	
<i>EcoRI</i> -ACT	<i>MseI</i> -CGG	126	p17_b126
<i>EcoRI</i> -ACT	<i>MseI</i> -CTT	300	p07_b300
<i>EcoRI</i> -AGA	<i>MseI</i> -CGC	118	p14_b118
<i>EcoRI</i> -AGG	<i>MseI</i> -CGT	60	p08_b060
<i>EcoRI</i> -ATA	<i>MseI</i> -CAT	340, 165	
<i>EcoRI</i> -ATA	<i>MseI</i> -CCA	174	p09_b174
<i>EcoRI</i> -ATC	<i>MseI</i> -CGC	438	p18_b438
<i>EcoRI</i> -ATC	<i>MseI</i> -CTA	275, 468, 481	p10_b275, p10_b468, p10_b481
<i>EcoRI</i> -ATG	<i>MseI</i> -CAT	165	p05_b162

In der Tabelle 3.1.1.2 sind die mit Hilfe der AFLP-Marker identifizierten YACs aufgelistet. Während sieben YACs jeweils einen der AFLP-Marker aufwiesen, besitzen die YACs Y5C6 und Y102H12 jeweils zwei der AFLP-Markerloci. Die YACs Y7A8 und Y29B6 wurden beide durch den Marker p15_b090, die YACs Y67G1 und Y89F10 durch den Marker p05_b162 detektiert.

Chromosom II

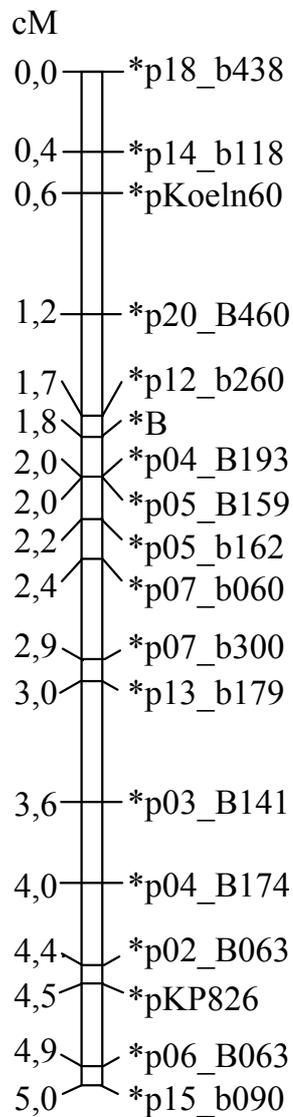


Abbildung 3.1.1.1: AFLP-Karte der Region des Schossgens. Gezeigt ist ein 5 cM-Ausschnitt der zum Chromosom II korrespondierenden Kopplungsgruppe der Population 960701 (EL MEZAWY, 2001). Links: genetische Distanzen in cM. *B: Schossgen; pKoeln60 und pKP826: RFLP-Marker.

Tabelle 3.1.1.2: Mit AFLP identifizierte YACs. AFLP-Markerloci sind in kodierter Form nach EL MEZAWY (2001) angegeben. *: AFLP-Marker, die jeweils zwei YACs identifizierten.

Bezeichnung	Mikrotiterplatte	Zeilen-/Spalten-Position	identifizierende AFLP-Marker
Y5C6	5	C6	p07_b300, p12_b260
Y7A8	7	A8	p15_b090 *
Y29B6	29	B6	p15_b090 *
Y67G1	67	G1	p05_b162 *
Y73G8	73	G8	p16_b084
Y81D10	81	D10	p18_b438
Y89F10	89	F10	p05_b162 *
Y99F8	99	F8	p10_b468
Y102H12	102	H12	p13_b179, p14_b118

Tabelle 3.1.1.3: Zusammenfassung der Ergebnisse des AFLP-Sichtens der YAC-Bank. MT-Pools: Mikrotiterplatten-Pools; ZS-Pools: Zeilen-/Spalten-Pools.

Untersuchte AFLP-Marker	20
AFLP-Marker mit MT-Pool-Identifikation	15
Mit Hilfe der AFLP-Marker identifizierte MT-Pools	29
• davon bestätigt mit ZS-Pools	9
• davon bestätigt als Einzel-YAC	9

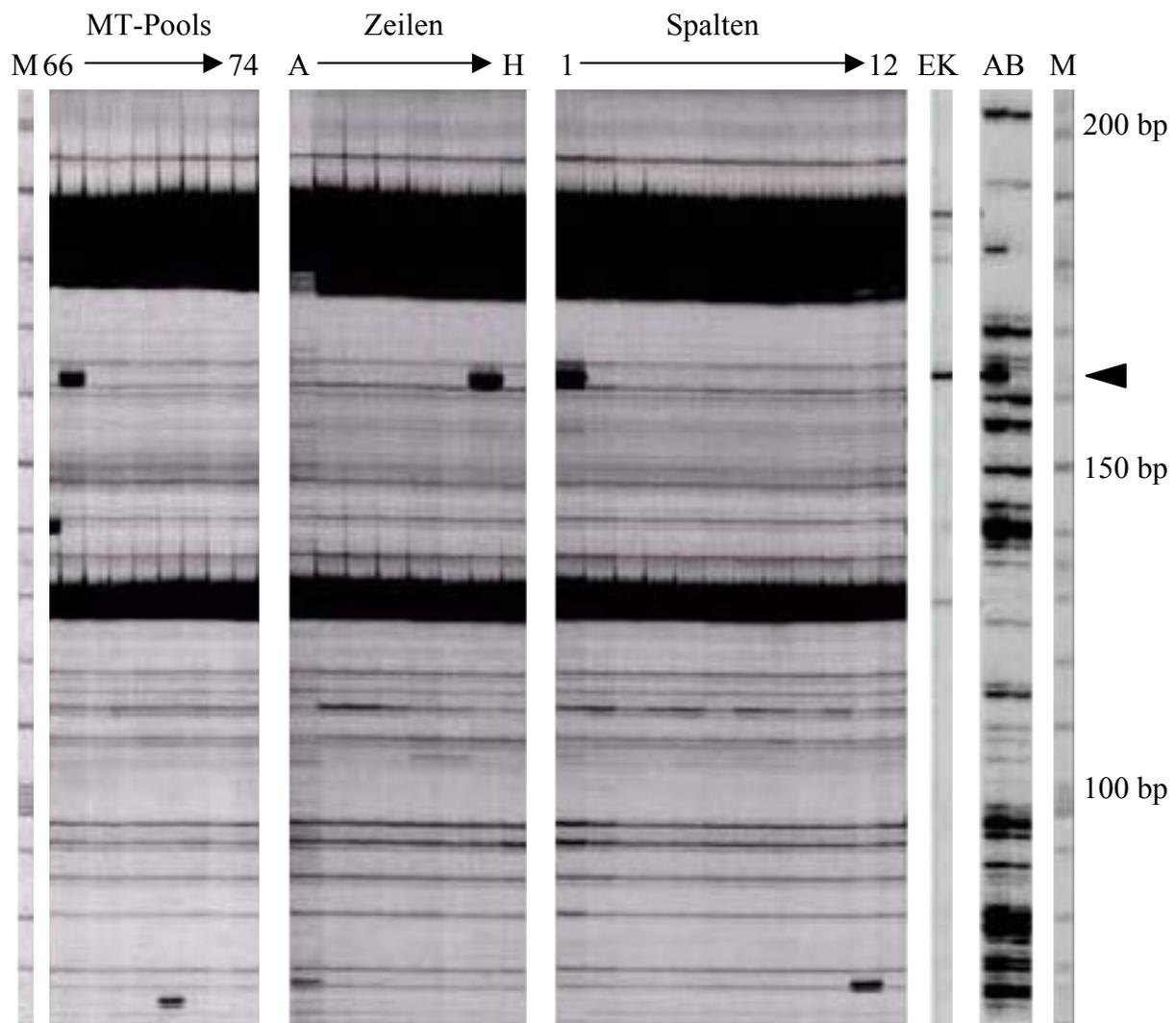


Abbildung 3.1.1.2: Identifikation des YACs Y67G1 mittels AFLP-Technik. MT-Pools: Sichten der Mikrotiterplatten-Pools (66→74); Zeilen, Spalten: Sichten der Zeilen- (A→H) und Spalten-Pools (1→12); EK: Einzelklon aus MT-Pool 67, Zeile G, Spalte 1; H: Hefe als Kontrolle; M: SequaMark™-Größenmarker; A: einjährige Zuckerrübe (93167p); B: zweijährige Zuckerrübe (A906001). Der Pfeil markiert das *b*-spezifische Fragment des Markers p05_b162.

3.1.2 *Chromosome walking*

Neben AFLPs wurden klonierte YAC-Enden als Sonden zum Sichten der YAC-Bank verwendet (*chromosome walking*). Anfangs standen nur die YAC-Enden der durch AFLP identifizierten YACs zur Verfügung. Später wurden auch die YAC-Enden der durch *chromosome walking* identifizierten YACs zum Sichten eingesetzt.

Für das *chromosome walking* wurden die 24 klonierten YAC-Enden (Kapitel 3.1.3) verwendet. Von den Sequenzen der Enden wurden Primer abgeleitet und deren Spezifität durch eine PCR mit YAC-DNA und Zuckerrüben-DNA (*BB*, *bb*) getestet.

Von sieben YAC-Enden konnten keine Primerpaare abgeleitet werden, die spezifisch für die entsprechenden YAC-Enden waren. Diese nicht verwendeten YAC-Enden enthielten überwiegend repetitive DNA, die zum Teil Homologien zu Retrotransposons aufwies.

Obwohl das YAC-Ende Y73G8R Homologien zu Retrotransposons aufwies, konnten von diesem Ende spezifische Primer abgeleitet werden, die das Sichten der Bank ermöglichten. Diese Primer identifizierten sechs Mikrotiterplatten-Pools, von denen nur einer als Einzelklon verifiziert wurde.

Für das Sichten auf Mikrotiterplatten-Ebene wurden 17 YAC-Enden verwendet. Diese sind mit den zum Sichten eingesetzten Primer in Tabelle 3.1.2.1 aufgeführt. Die YAC-Enden identifizierten zwischen einem und sieben Mikrotiterplatten-Pools. Insgesamt wurden durch die 17 YAC-Enden 48 Pools identifiziert. Je YAC-Ende wurden ein bis sieben Mikrotiterplatten-Pools erhalten (Durchschnitt: 2,8).

Von den 48 positiven Mikrotiterplatten-Pools wurden nur 25 über die Zeilen- und Spalten-Pools verifiziert. Dabei wurden maximal zwei pro YAC-Ende bestätigt. Die Verifikationen als Einzel-YAC-Klone waren jeweils positiv. Neun der YAC-Enden konnten nur den YAC identifizieren, von dem das YAC-Ende kloniert wurde (Tabelle 3.1.2.2). Acht weitere YAC-Enden identifizierten andere, überlappende YACs (Tabelle 3.1.2.2).

Die YAC-Enden der mittels AFLP identifizierten YACs identifizierten drei bisher nicht bekannte YACs (Y49F7, Y85A6, Y101A7). Mit den YAC-Enden von Y49F7, Y85A6 und Y101A7 wurden keine weiteren spezifischen Klone identifiziert.

Tabelle 3.1.2.1: Für das *chromosome walking* eingesetzte YAC-Enden. L/R: linkes und rechtes YAC-Ende. Die Primersequenzen sind im Anhang 8.3 aufgeführt.

YAC	Ende	PCR-Primer	
Y5C6	L	Y5C6L1	Y5C6L2
Y5C6	R	Y5C6R1	Y5C6R2
Y29B6	L	Y29B6L3	Y29B6L4
Y29B6	R	Y29B6R1	Y29B6R2
Y67G1	L	Y67G1L1	Y67G1L2
Y67G1	R	Y67G1R1	Y67G1R2
Y73G8	L	Y73G8L1	Y73G8L2
Y73G8	R	Y73G8R1	Y73G8R2
Y81D10	L	Y81D10L1	Y81D10L2
Y81D10	R	Y81D10R1	Y81D10R4
Y89F10	L	Y89F10L2	Y89F10L5
Y89F10	R	Y89F10R1	Y89F10R6
Y99F8	L	Y99F8L1	Y99F8L2
Y99F8	R	Y99F8R1	Y99F8R2
Y101A7	L	Y101A7L1	Y101A7L2
Y101A7	R	Y101A7R1	Y101A7R2
Y102H12	R	Y102H12R4	Y102H12R9

Tabelle 3.1.2.2: Ergebnisse der *chromosome walking*-Experimente. In den Spalten MT-Pools (Mikrotiterplatten-Pools) und ZS-Pools (Zeilen-/Spalten-Pools) ist die Anzahl positiver Pools angegeben. L/R: linkes bzw. rechtes YAC-Ende.
*: identifiziert nur den YAC, von dem das YAC-Ende stammt.

YAC	Ende	MT-Pools	ZS-Pools	überlappende YACs
Y5C6	L	1	1	*
Y5C6	R	2	1	*
Y29B6	L	3	2	Y7A8
Y29B6	R	2	2	Y7A8
Y67G1	L	4	2	Y85A6
Y67G1	R	2	2	Y89F10
Y73G8	L	2	2	Y101A7
Y73G8	R	6	2	Y49F7
Y81D10	L	3	1	*
Y81D10	R	5	1	*
Y89F10	L	1	1	*
Y89F10	R	5	2	Y67G1
Y99F8	L	1	1	*
Y99F8	R	7	1	*
Y101A7	L	2	2	Y73G8
Y101A7	R	1	1	*
Y102H12	R	1	1	*

Tabelle 3.1.2.3: Übersicht über die Ergebnisse der drei „Sichtungsebenen“ der *chromosome walking*-Experimente. MT-Pools: Mikrotiterplatten-Pools; ZS-Pools: Zeilen-/Spalten-Pools.

Insgesamt untersuchte YAC-Enden	24
für das <i>chromosome walking</i> verwendbare YAC-Enden	17
Mit Hilfe der Enden identifizierte MT-Pools	48
• davon bestätigt mit ZS-Pools	25
• davon bestätigt als Einzel-YAC	25
insgesamt identifizierte YACs	12

3.1.3 Bestimmung der YAC-Insertionsgrößen

Zur näheren Charakterisierung der identifizierten YACs wurde hochmolekulare DNA isoliert und auf einem Pulsfeldgel aufgetrennt. Zur Bestimmung der YAC-Größe dienten Hefe-Chromosomen und der *low range*-PFG-Marker. Tabelle 3.1.3.1 gibt eine Übersicht über die Insertionsgrößen. Die Größe der YACs variierte zwischen etwa 40 und 330 kb.

Der Klon Y67G1 enthielt neben den Hefe-Chromosomen zwei YACs mit 100 kb bzw. 150 kb. SOUTHERN-Hybridisierungen mit den YAC-Enden des überlappenden Klons Y89F10 auf eine Membran eines Pulsfeldgels zeigten, dass das Ende Y89F10R nur die 150 kb große Bande identifizierte. Die 100 kb große Bande wurde durch die Sonde nicht detektiert. Diese Ergebnisse wurden durch PCR-Versuche bestätigt. Dazu wurde die DNA der einzelnen Banden aus einem Pulsfeldgel isoliert. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird nur auf die 150 kb großen Bande des YACs Y67G1 eingegangen.

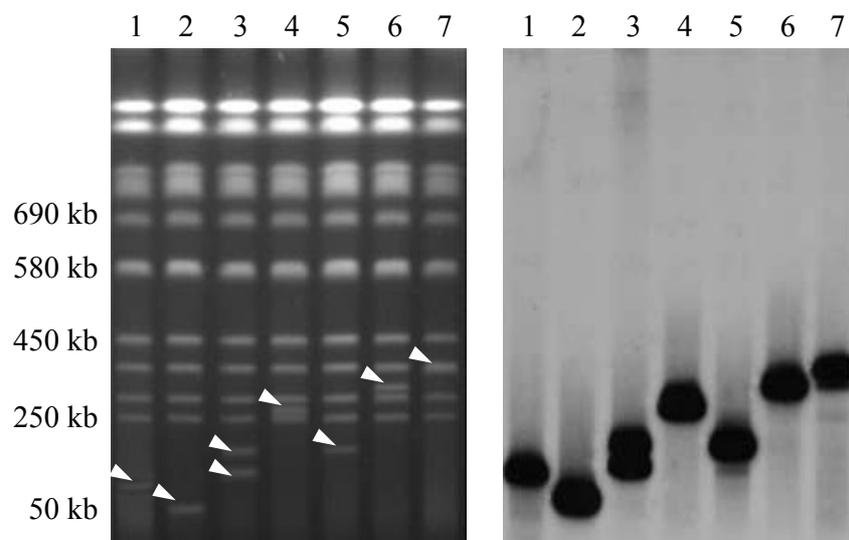


Abbildung 3.1.3.1: Pulsfeldgel zur Bestimmung der YAC-Insertionsgrößen. Links: Ethidiumbromid gefärbtes Pulsfeldgel (Pulszeit: 60-90 Sek.); rechts: dazugehörige nicht-radioaktive SOUTHERN-Hybridisierung mit pBR322 (Expositionszeit: 5 Min.). Weiße Pfeile markieren die YAC-Banden auf dem Pulsfeldgel. 1-7: Y5C6, Y29B6, Y67G1, Y73G8, Y89F10, Y99F8, Y102H12.

Tabelle 3.1.3.1: Zusammenfassende Darstellung aller isolierten YACs. Angegeben sind die Art der Identifizierung (AFLP oder YAC-Ende), die Insertionsgröße und die Länge der klonierten YAC-Enden, sowie Angaben zu überlappenden YACs. L/R: linkes bzw. rechtes YAC-Ende. *: Y67G1 enthält zwei YAC-Banden!

YAC	Identifikation durch	Größe in kb	YAC-Ende	Länge End-Sequenz in bp	Überlappung mit
Y5C6	p07_b300	70	L	301	
	p12_b260		R	1257	

Y7A8	p15_b090	200	L	1030	
			R	427	
Y29B6	p15_b090	40	L	1146	Y7A8
			R	923	Y7A9
Y49F7	Y73G8R	50	L	375	
			R	1879	
Y67G1	p05_b162	150	L	1731	Y85A6
		(100*)	R	647	Y89F10
Y73G8	p16_b084	240	L	1463	Y49F7
			R	1206	Y101A6
Y81D10	p18_b438	70	L	1020	
			R	1705	
Y85A6	Y67G1R	140	L	683	
			R	357	
Y89F10	p05_b162	150	L	510	Y67G1
			R	533	
Y99F8	p10_b468	300	L	258	
			R	522	
Y101A7	Y73G8L	160	L	803	Y73G8
			R	445	
Y102H12	p13_b179	330	L	1141	
	p14_b118		R	833	

3.1.4 Isolierung von YAC-Enden

Für die *chromosome walking*-Experimente und zur Erstellung des *contigs* wurden die 24 Enden der zwölf identifizierten YACs kloniert und sequenziert. Zur Klonierung wurde das Verfahren der inversen PCR eingesetzt. Im Fall von kleinen klonierten Fragmenten (bis ca. 350 bp) wurde versucht, weitere YAC-Endsequenz zu klonieren. Zur Amplifikation wurden YAC-Arm-spezifische oder/und sequenzspezifische Primer verwendet. In der Tabelle 3.1.3.2 sind die klonierten YAC-Enden und die Sequenzlänge zusammengestellt. Die Sequenzen der YAC-Enden stammen von einem bis zu drei überlappenden Klonen (s. Anhang 8.1) und variieren in der Länge zwischen ca. 300 bp und ca. 1900 bp.

Tabelle 3.1.4.1: Auszug aus den Ergebnisse der Homologie-Vergleiche der YAC-Endsequenzen mittels des BLASTN-Algorithmuses gegen Pflanzen-Sequenzdatenbanken. Die vollständigen Ergebnisse befinden sich im Anhang 8.4.

YAC-Ende	Homologien	Accession-Nummer [P (N)]
Y7A8R	Retrotransposon	diverse
Y29B6L	Homologien zu 26S rDNA-Motiv	diverse, z. B. Z95378 [3,7e ⁻¹²]
Y49F7L	Retrotransposon	diverse
Y49F7R	Retrotransposon	diverse
Y73G8R	Retrotransposon; repetitive Zuckerrüben-Sequenz (pDRV2)	diverse; Z69352 [6,0e ⁻⁰⁶]
Y85A6R	Retrotransposon	diverse
Y99F8L	Satelliten-DNA aus <i>B. vulgaris</i> (pBV1)	Z22849 [0,00092]
Y102H12L	Retrotransposon	diverse
Y102H12R	mitochondrial prozessierende Peptidase	diverse, z. B. X80235 [3,7e ⁻⁵⁰]

Die Homologie-Vergleiche der YAC-Endsequenzen mit Sequenzen aus Datenbanken zeigten für einige Klone starke Homologien zu Retrotransposons. Das Ende Y99F8L war homolog zu Zuckerrüben-Satelliten-DNA (pBV1). Zwei YAC-Enden (Y102H12R, Y81D10L) enthielten potentielle Leserahmen. Während das YAC-Ende Y102H12R auf DNA- und Protein-Ebene starke Homologie zu einer mitochondrial prozessierenden Peptidase aufwies, wurden keine Gene gefunden, die Homologien zum Ende Y81D10L aufwiesen.

Die homologen Sequenzen aus *A. thaliana* wurden hinsichtlich ihrer Lokalisation auf den fünf Arabidopsis-Chromosomen untersucht. Homologien zu allen fünf Chromosomen wurden gefunden. Eine klare Region mit überdurchschnittlich vielen Homologien wurde nicht gefunden, so dass keine deutliche Synthänie zwischen einem Arabidopsis-Bereich und der Region des Schossgens ermittelt werden konnte. Lediglich zwei Arabidopsis-Regionen zeigten eine erhöhte Anhäufung von homologen Sequenzen: der obere Bereich des Chromosoms IV und der untere Bereich des Chromosoms V.

3.1.5 Lokalisation der YAC-Enden

Versuche zur genetischen Lokalisation der YAC-Enden sollten Aufschluss über potentiell chimären YACs geben bzw. bestätigen, dass die isolierten YACs aus der Region des Schossgens stammen.

Durch Testhybridisierungen wurden Restriktionsenzyme bestimmt, die zwischen DNA-Pools aus homozygot einjährigen und zweijährigen Zuckerrüben der Population 970601 differenzierten. Gleichzeitig wurde bestimmt, ob die als Sonden dienenden YAC-Enden repetitiven oder singulären Charakter aufwiesen. Als Restriktionsenzyme wurden *DraI*, *BamHI*, *EcoRI*, *EcoRV* und *HindIII* verwendet.

Die Untersuchung erfolgte an 40 Einzelpflanzen der Population 960701. Unter den untersuchten Pflanzen befanden sich nach den Ergebnissen der genetischen Kartierung mit AFLPs je 10 homozygot ein- (*BB*) und zweijährige (*bb*) sowie 20 heterozygote (*Bb*) Zuckerrüben. Als Distanzmaß zwischen Marker und Schossgen wurde die Anzahl der Rekombinationen zwischen Schossgen und Markerloci verwendet.

Einige YAC-Enden konnten nicht lokalisiert werden. Dies beruhte überwiegend auf dem repetitiven Charakter der Endsequenzen. Für das singuläre YAC-Ende Y67G1R wurde kein Polymorphismus zwischen homozygot einjährigen (*BB*) und zweijährigen (*bb*) DNA-Pools detektiert. Die Ergebnisse der genetischen Lokalisation von sechs YAC-Enden (Marker) sind in Tabelle 3.1.5.1 zusammengefasst.

Zwischen Y5C6R und dem Schossgen wurden fünf Rekombinationen detektiert. Je eine Rekombination trat zwischen Y29B6L, Y73G8L und Y99F8R und dem Schossgen auf. Keine Rekombination wurde zwischen den Markerloci Y7A8L und Y102H12R und dem Schossgen beobachtet.

Tabelle 3.1.5.1: Lokalisierte YAC-Enden. Die von den YAC-Enden abgeleiteten Sonden sind in Tabelle 2.3.1.1 aufgeführt. 40 Individuen wurden getestet, wobei aber nicht immer alle ausgewertet werden konnten. Rekomb./Gesamt gibt die Anzahl der Rekombinanten im Verhältnis zur Anzahl ausgewerteter Pflanzen wieder. Der Wert in Prozent ausgedrückt, ist in der Spalte % Rekomb. angegeben.

YAC-Ende/Sonde	Enzym	Rekomb./Gesamt	% Rekomb.
Y5C6R	<i>EcoRI</i>	5/40	12,5
Y7A8L	<i>BamHI</i>	0/35	0
Y29B6L	<i>EcoRV</i>	1/35	3
Y73G8L	<i>EcoRI</i>	1/33	3
Y99F8R	<i>EcoRI</i>	1/38	3
Y102H12R	<i>EcoRV</i>	0/40	0

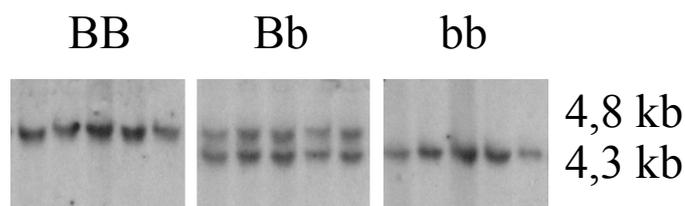


Abbildung 3.1.5.1: Nicht-radioaktive SOUTHERN-Hybridisierung mit der Sonde Y102H12R auf mit *EcoRV* restringierte Zuckerrüben-DNA der Population 960701. BB: *BB*-Individuen; Bb: *Bb*-Individuen; bb: *bb*-Individuen. Expositionszeit: 10 Min.

3.1.6 Entwicklung von PCR-Markern aus YAC-Enden

Um die YAC-Endsequenzen für eine markergestützte Selektion auf das Schossgen in der Zuckerrüben-Züchtung nutzbar zu machen, wurde versucht, fünf YAC-Enden in PCR-gestützte Marker umzuwandeln. Zur Untersuchung wurden stets Pflanzen der Population 960701 verwendet. Nur ein YAC-Ende (Y73G8R) konnte auf Grund nicht vorhandener Sequenzunterschiede zwischen ein- (*BB*) und zweijährigen (*bb*) Zuckerrüben nicht in einen einfachen PCR-Marker umgewandelt werden. Von den vier entwickelten PCR-gestützten Markern erwies sich einer als dominant, während die anderen drei codominant ausgewertet werden konnten.

Marker-Entwicklung für Y29B6R:

Von der Sequenz des YAC-Endes Y29B6R wurden zwei Primer abgeleitet. Eine Amplifikation wurde nur bei zweijährigen Pflanzen (*bb*) beobachtet. Aus DNA homozygot einjähriger Pflanzen (*BB*) wurde kein Fragment amplifiziert. Der PCR-Marker für Y29B6R unter Verwendung der Primer Y29B6R1 und Y29B6R2 (Sequenzen: s. Anhang 8.2) ist somit nur dominant auszuwerten. Der Unterschied auf Sequenzebene zwischen ein- und zweijährigen Zuckerrüben der Population wurde nicht näher charakterisiert. Die Sequenz des *b*-spezifischen Fragments ist im Anhang 8.5 gezeigt. Eine Testkartierung in 232 Pflanzen der Kartierungspopulation zeigte bei der dominanten Auswertung zehn Rekombinationen zwischen Schossgen und Marker.

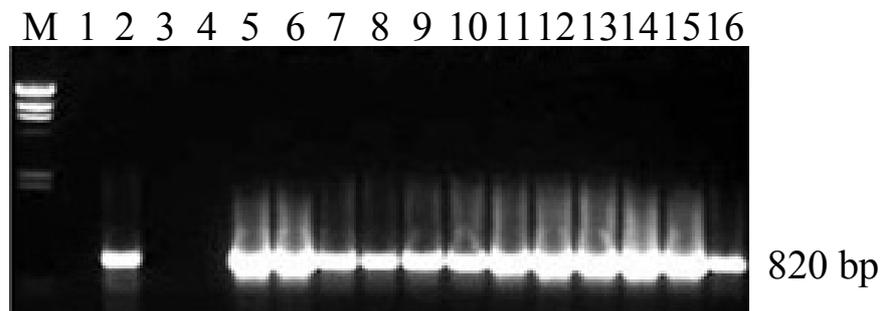


Abbildung 3.1.6.1: PCR-Test des Markers Y29B6R mit den Primern Y29B6R1 und Y29B6R2 an Individuen der Population 960701. Lt. Kartierung: 1-4: *BB*; 5-12: *Bb*; 13-16: *bb*. M: λ /HindIII. Individuum 2 stellt eine Rekombinante dar.

Markerentwicklung für Y73G8L:

Ein Sequenzvergleich zwischen ein- und zweijährigen Pflanzen zeigte, dass 15 Basenpaare in den zweijährigen Pflanzen deletiert waren. Die zwei Primer Y73G8L4 und Y73G8L5 wurden zur Markeranalyse von der Sequenz des YAC-Endes abgeleitet. Sie liefern ein 151 bp großes Fragment bei homozygot einjährigen (*BB*) und ein 136 bp großes Fragment bei zweijährigen (*bb*) Individuen (Sequenzvergleich: Anhang 8.6). Die Auswertung des Markers kann sowohl in einem hochprozentigen Agarose-Gel (z. B. Metaphor[®]) als auch in einem Polyacrylamid-Gel erfolgen.

Markerentwicklung für Y89F10L:

Wie schon bei dem Marker Y73G8L wurde eine vergleichende Sequenzierung durchgeführt. Ein Basenaustausch wurde detektiert (Sequenzvergleich: Anhang: 8.7). Zweijährige Pflanzen (*bb*) weisen ein Thymin, homozygot einjährige (*BB*) ein Adenin an der Position 144 bp (von der YAC-Klonierungstelle *EcoRI*) auf. Die Mutation wirkte sich nicht auf eine Restriktionsschnittstelle aus. Der Marker kann als SNP detektiert werden. Alternativ wurden Primer entwickelt, die die Mutation an der vorletzten Base des 3'-Endes enthalten (Y89F10L9A für

einjährig/annuell, Y89F10L9B für zweijährig/biennell). Die Detektion erfolgt in Form von zwei dominant auszuwertenden PCR-Reaktionen je zu untersuchendes Individuum, wobei der Primer Y89F10L2 als Gegenprimer Verwendung findet.

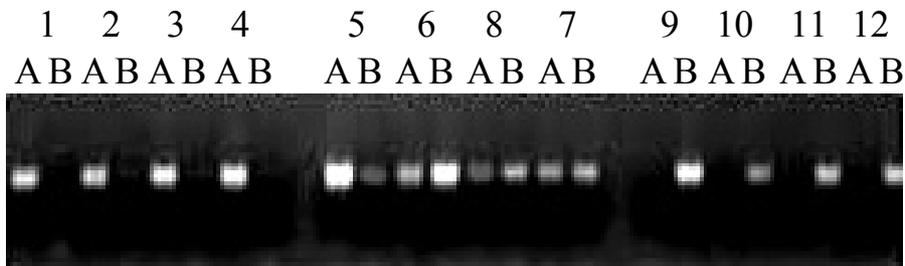


Abbildung 3.1.6.2: PCR-Test für den Marker Y89F10L. Für jedes Individuum wurden zwei Reaktionen durchgeführt, die dominant ausgewertet wurden (s. o.). A bzw. B: PCR mit dem *B*-spezifischen Primer Y89F10L9A bzw. mit dem *b*-spezifischen Primer Y89F10L9B. Als zweiter Primer wurde jeweils Y89F10L2 verwendet. 1-4: *BB*; 5-8: *Bb*; 9-12: *bb*.

Markerentwicklung für Y102H12R:

Eine Reihe von Primern wurde von der klonierten YAC-Endsequenz abgeleitet und an DNA ein- und zweijähriger Individuen getestet. Die Primer Y102H12R6 und Y102H12R11 ergaben dabei unterschiedlich große Amplifikate. Aus DNA von homozygot einjährigen (*BB*) Zuckerrüben wurde ein Produkt von ca. 1000 bp amplifiziert, während homozygot zweijährige (*bb*) Pflanzen ein ca. 700 bp großes Produkt lieferten. Heterozygote wiesen auf dem Agarose-Gel neben den Fragmenten von ca. 1000 bp und ca. 700 bp eine Heterodimer-Bande auf. Das Auftreten einer Heterodimer-Bande deutet darauf hin, dass die Amplifikate stark homolog sind und dass der Polymorphismus eventuell durch eine interne Duplikation entstanden ist. Diese Vermutung wird durch die schwache Intensität der 1000 bp großen Bande und der Heterodimer-Bande gestützt. Der Marker identifizierte keine Rekombinanten in einer Population von 232 Individuen, was auf eine sehr enge Kopplung zum Schossgen hinweist.

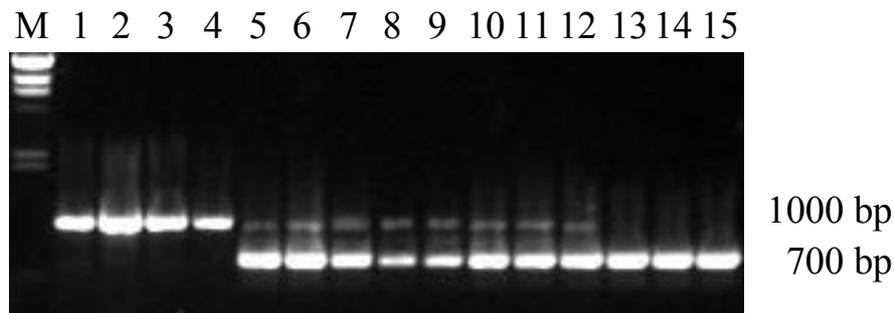


Abbildung 3.1.6.3: PCR-Markertest für Locus Y102H12R mit den Primern Y102H12R6 und Y102H12R11. M: Größenmarker λ /HindIII; 1-4: BB; 5-12: Bb; 13-15: bb.

3.2 Erstellung einer physikalischen Karte

Zur Erstellung eines *contigs* bzw. einer physikalischen Karte aus den isolierten YAC-Klonen (Tabelle 3.1.3.1) wurden zwei Verfahren angewendet: *chromosome walking* und AFLP-*fingerprinting*.

chromosome walking:

Das Sichten erfolgte durch eine Polymerase-Ketten-Reaktion mit Primern, die von den klonierten YAC-Enden abgeleitet wurden. Als Matrize wurde YAC-DNA eingesetzt. Bei allen *chromosome walking*-Versuchen wurden nur Primerkombinationen verwendet, bei denen nur ein einziges Fragment aus Zuckerrüben-DNA amplifiziert wurde. Eine Amplifikation aus Hefe-DNA trat dabei nur bei der Primerkombination Y29B6L4/Y29B6L4 auf. Die Größe des aus Hefe amplifizierten Fragments unterschied sich von der des Zuckerrübenfragments, so dass die Auswertung nicht gestört wurde. Traten bei mehreren YACs Fragmente mit den gleichen Primern auf, so wies dies auf eine Überlappung der entsprechenden Klone hin. Tabelle 3.2.1 fasst die gefundenen Überlappungen zusammen.

Tabelle 3.2.1: Zusammenfassung der mittels *chromosome walking* detektierten Überlappungen von YAC-Klonen.

YAC-Ende	Überlappende Klone
Y29B6L	Y7A8
Y29B6R	Y7A8
Y67G1L	Y89F10
Y67G1R	Y85A6
Y73G8L	Y49F7
Y73G8R	Y101A6
Y89F10R	Y67G1

AFLP-fingerprinting:

Überlappungen von Klonen werden bei dieser Methode durch einen Vergleich der AFLP-Muster ermittelt. Um das Sichten effektiver zu gestalten, werden Analysen mit geringer Spezifität durchgeführt, d.h. wenige selektive Basen je AFLP-Primer.

Für die Restriktion wurden die Enzyme *EcoRI* und *MseI* verwendet. Zum *fingerprinting* wurden Primerkombinationen mit je zwei selektiven Basen an den *EcoRI*- und *MseI*-Primern (*EcoRI*+2, *MseI*+2) eingesetzt. Als erste selektive Base besaßen die Primer entweder Adenin oder Cytosin. Zusätzlich wurden Primerkombinationen mit allen möglichen *EcoRI*+1- und *MseI*+2-Primern verwendet.

Die *fingerprinting*-Versuche wurden nur mit den Klonen Y5C6, Y7A8, Y29B6, Y67G1, Y73G8, Y81D10, Y89F10 und Y102H12 durchgeführt. Insgesamt wurden 96 polymorphe AFLP-Banden ausgewertet. 67 Banden („Einzel-AFLPs“) traten nur bei jeweils einem Klon auf. Die verbleibenden 29 AFLP-Banden kamen in zwei bis sieben der acht Klone vor. Neun (Y81D10) bis 33 (Y102H12) spezifische AFLP-Banden kamen je YAC-Klon vor. Die mit Hilfe der Insertionsgröße geschätzte physikalische Distanz zweier AFLP-Banden auf einem

YAC lag im Mittel bei ca. 8 kb und variierte zwischen ca. 3 kb (Y29B6) und ca. 14 kb (Y89F10). Der Anteil von Einzel-AFLPs lag zwischen 0 % (Y29B6) und 58 % (Y7A8).

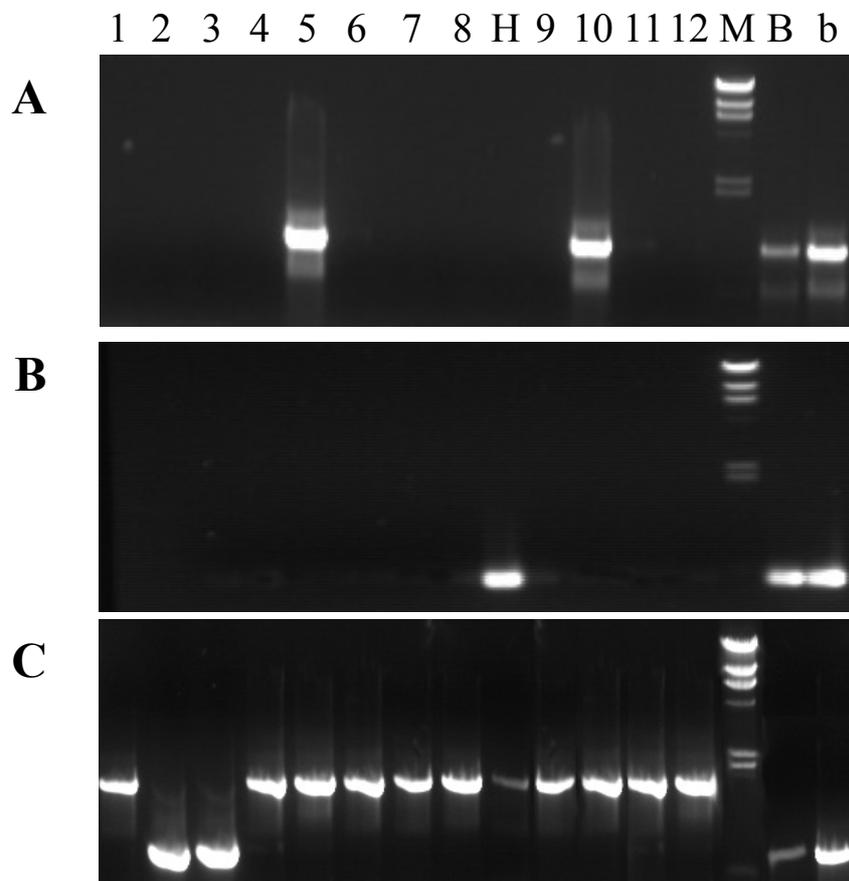


Abbildung 3.2.1: PCR-Beispiele des *chromosome walking* mit detektierter Überlappung (A), ohne Überlappung (B) und mit zusätzlicher Amplifikation einer unspezifischen Bande (C). **A:** Primerkombination (PK) Y73G8R1/Y73G8R2; **B:** PK Y102H12R4/Y102H12R9; **C:** PK Y29B6L3/Y29B6L4. 1: Y5C6; 2: Y7A8; 3: Y29B6; 4: Y67G1; 5: Y73G8; 6: Y81D10, 7: Y89F10, 8: Y102H12, 9: Y99F8; 10: Y49F7; 11: Y85A6; 12: Y101A7; H: Hefe; M: λ /HindIII; B bzw. b: BB bzw. bb Zuckerrüben-DNA.

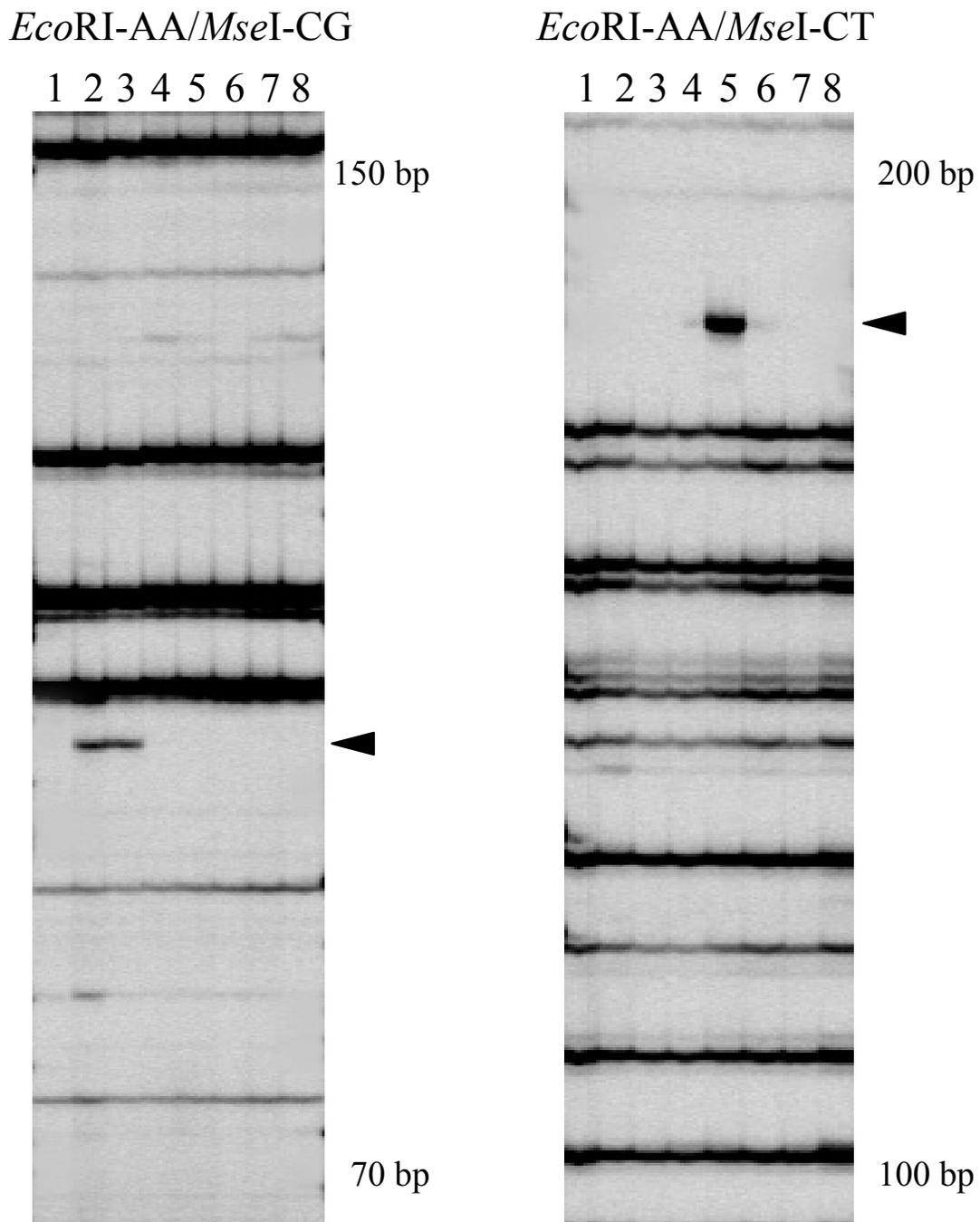


Abbildung 3.2.2: AFLP-fingerprinting mit den Primerkombinationen *EcoRI-AA/MseI-CG* und *EcoRI-AA/MseI-CT*. Links: YAC-spezifisches Signal in den Spuren 2 und 3. Rechts: YAC-spezifisches Signal nur in einer Spur („Einzel-AFLP“). 1-8: Y5C6, Y7B8, Y29B6, Y67G1, Y73G8, Y81D10, Y81D10, Y89F10, Y102H12. Pfeile: YAC-spezifische Amplifikate.

Tabelle 3.2.2: Übersicht über die Ergebnisse des AFLP-*fingerprintings*. Einzel-AFLPs: nur in einem Klon vorkommende AFLP-Fragmente; Distanz zweier AFLPs: aus der gesamten Markerzahl und der Insertionsgröße geschätzte Distanz zwischen zwei AFLP-Markern.

YAC	Insertionsgröße in kb	AFLPs gesamt	Einzel-AFLPs	Distanz zweier AFLPs in kb
Y5C6	70	12	4	6
Y7A8	250	24	14	10
Y29B6	40	13	0	3
Y67G1	150	23	3	7
Y73G8	240	28	14	9
Y81D10	50	9	2	6
Y89F10	150	11	2	14
Y102H12	330	33	14	10

Die aus den Ergebnissen des *chromosome walkings* und der AFLP-*fingerprinting*-Analysen erstellten *contigs* sind in Abbildung 3.2.3 und Abbildung 3.3.1 dargestellt. Die YACs Y5C6, Y81D10, Y99F8 und Y102H12 überlappten mit keinem der anderen spezifischen YACs. Die verbleibenden acht YACs wurden zu drei *contigs* zusammengefügt (Abbildung 3.2.3). Der Anteil der Überlappung zweier Klone wurde mit Hilfe der gemeinsamen AFLP-Banden abgeschätzt. Y29B6 überlappte vollständig mit Y7A8. Die relative Lage der überlappenden YACs konnte nur z.T. anhand der *chromosome walking*-Ergebnisse festgelegt werden.

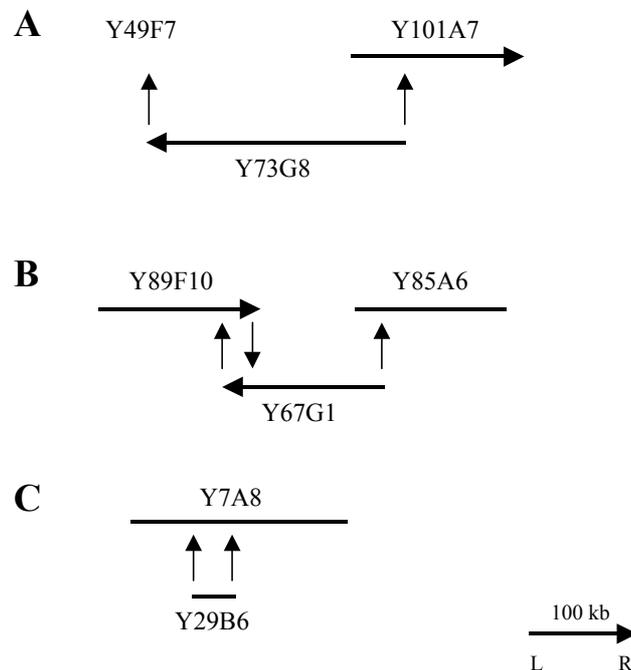


Abbildung 3.2.3: Darstellung der drei *contigs* (A, B, C), die mit Hilfe von *chromosome walking* und *AFLP-fingerprinting* erstellt wurden. Soweit bekannt, ist die Orientierung der YACs angegeben. Die Ergebnisse des *chromosome walkings* sind durch senkrechte Pfeile dargestellt. L, R: linkes bzw. rechtes YAC-Ende.

3.3 Genetische und physikalische Karte der Region des Schossgens

Das Schossgen wurde mittels AFLPs in der spaltenden Population 960701 genetisch kartiert (EL MEZAWY, 2001). Die erstellte genetische Karte wurde als Grundlage für die physikalische Kartierung herangezogen. Zusätzlich zur genetischen Karte (EL MEZAWY, 2001) wurde eine genetische „Karte“ der engen Region des Schossgens durch Anordnen von Rekombinanten „von Hand“ konstruiert und für die Erstellung der physikalischen Karte herangezogen. Ein Vergleich der beiden genetischen Karten untereinander und die erstellte physikalische Karte zeigt Abbildung 3.3.1.

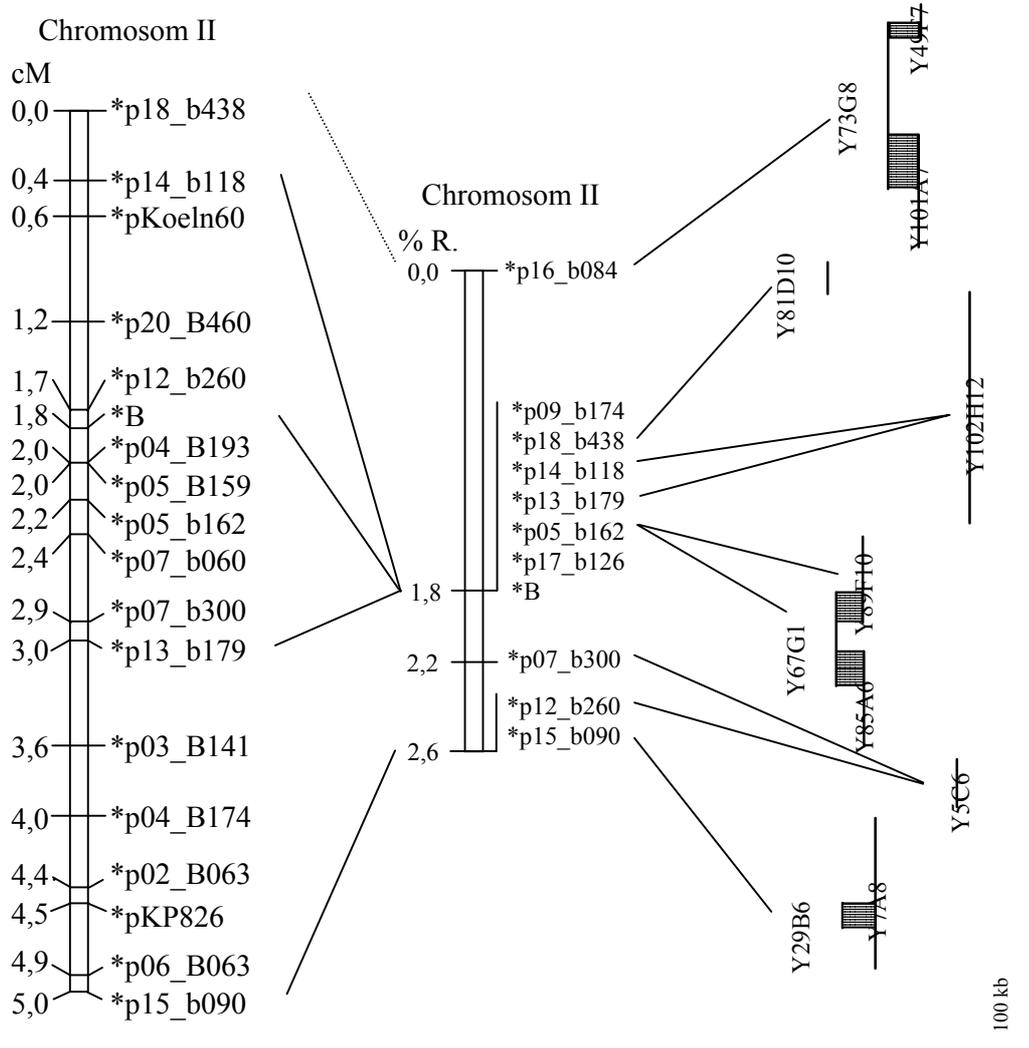


Abbildung 3.3.1: Vergleich der genetischen und physikalischen Karten der Region des Schossgens. Links: 5 cM-Intervall der auf 775 Individuen basierenden genetischen Karte von EL MEZAWY (2001). Mitte: genetische „Karte“ durch manuelles Anordnen von Rekombinanten (N=232). Rechts: physikalische Karte. Schraffiert: überlappende YAC-Bereiche. Die Linien zwischen den Karten verbinden gleiche Marker bzw. Marker und dazugehörige YACs. *B: Schossgen; %R.: % Rekombinationen.

3.4 Untersuchungen mit *A. thaliana*-Gensonden

Das Schossen und Blühen ist bei *Arabidopsis thaliana* sehr gut untersucht. Eine Reihe von Genen, die an der Blütenbildung bzw. an der Determination des Blühzeitpunktes beteiligt sind, wurden kloniert. Über einen genetischen Vergleich (*comparative genetics*) des Schossens zwischen *A. thaliana* und der Zuckerrübe besteht die Möglichkeit das Schossgen als ein Orthologes zu einem Blühen von *A. thaliana* zu isolieren. Zwei *A. thaliana*-Gene, die den Zeitpunkt der Blüte beeinflussen und eventuell Orthologe des Schossgens sind, wurden näher untersucht: *FRI* (*FRIGIDA*, JOHANSON *et al.*, 2000) und *FCA* (MACKNIGHT *et al.*, 1997).

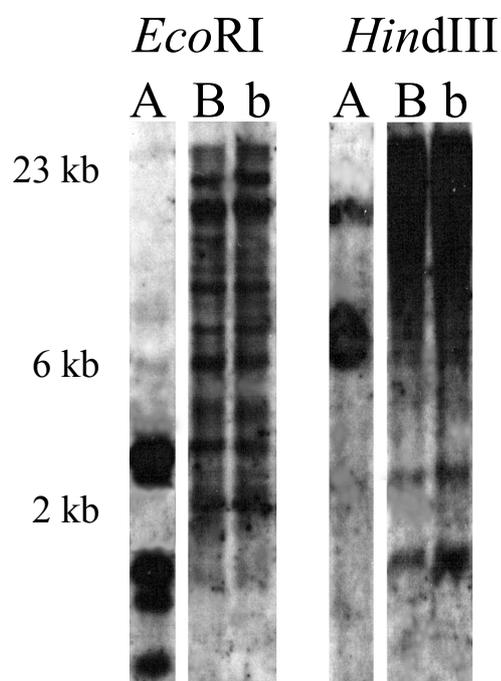


Abbildung 3.4.1: Nicht-radioaktive SOUTHERN-Hybridisierung mit der Sonde FCA- γ auf Zuckerrüben-DNA, die mit *EcoRI* bzw. *HindIII* restringiert wurde. A: *A. thaliana*; B: BB-DNA-Pool; b: bb-DNA-Pool. Expositionszeit: 10 Min.

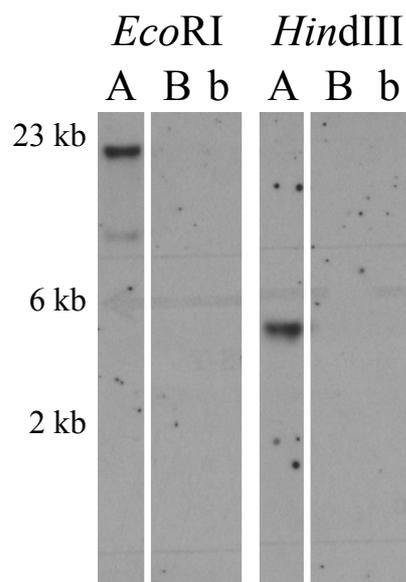


Abbildung 3.4.2: Nicht-radioaktive SOUTHERN-Hybridisierung mit der Sonde FRI-C auf Zuckerrüben-DNA, die mit *EcoRI* und *HindIII* restringiert wurde. A: *A. thaliana*; B: BB-DNA-Pool; b: *bb*-DNA-Pool. Expositionszeit: 5 Min.

Die Hybridisierung mit *FCA* (Sonde: *FCA-γ*) ergab mehrere Signale auf Zuckerrüben-DNA, die auf eine *multi copy*-Sonde hinweisen. *FCA* zeigte keine Differenzierung (Abbildung 3.4.1) zwischen homozygot einjährigen (*BB*) und homozygot zweijährigen (*bb*) Zuckerrüben. Die Ergebnisse der Hybridisierung lassen vermuten, dass die Sonde für *FCA* ein Motiv enthält, welches in mehreren Kopien in der Zuckerrübe und wahrscheinlich auch in mehr als einer Kopie in *Arabidopsis thaliana* vorliegt. Eine verkleinerte Sonde könnte zu einer höheren Spezifität führen. Trotz geringer Stringenz wurden keine homologen Signale für *FRI* (Sonde: FRI-C) detektiert (Abbildung 3.4.2).

3.5 Erstellung einer Zuckerrüben-BAC-Bank

Aus der doppelhaploiden Zuckerrübenlinie KWS2320 wurde eine BAC-Bank erstellt. Dafür wurden verschiedene Methoden der DNA-Isolierung, der Partialrestriktion, der Größenfraktionierung und der anschließenden Wiedergewinnung der DNA getestet. Zusätzlich wurde das Verhältnis von Vektor-DNA zu fraktionierter Zuckerrüben-DNA in den Ligationen variiert.

Erste Versuche zur Klonierung von BACs wurden mit dem Enzym *EcoRI* in den Vektor pBeloBAC-Kan (MOZO *et al.*, 1998) durchgeführt. Verschiedene Kombinationen aus verschiedenen HMW-DNA-Isolationsmethoden (KLEINE, 1993; ZHANG, 1999; CHOI & WING, 1999), Größenfraktionierungen (MOZO *et al.*, 1998; NAKAMURA *et al.*, 1997, KLEIN-LANKHORST *et al.*, 1994; OSOEGAWA *et al.*, 1998) und Methoden zur Wiedergewinnung der fraktionierten DNA (MOZO *et al.*, 1998; STRONG *et al.*, 1997) wurden ausgetestet. Keine der Kombinationen führte zur erfolgreichen BAC-Klonierung. Die durchschnittliche Insertionsgröße lag bei allen Versuchen unter 50 kb. Die erzeugten weißen Klone waren im Durchschnitt zu 72 % ohne Insertion (Falsch-Positive), bei einigen Versuchen waren sogar 100 % der weißen Klone falsch-positiv. Untersuchungen einiger Falsch-Positiver mit dem Restriktionsenzym *NotI* zeigte, dass ca. 20 % der Klone größere Deletionen aufwiesen. Die verbleibenden 80 % unterschieden sich gelelektrophoretisch nicht vom unbeschädigten Vektor. Vergleichende Ligationsansätze zeigten, dass die Anwesenheit von Fremd-DNA im Ligationsansatz offenbar die Religation beschädigter Vektoren und damit die Entstehung von Falsch-Positiven begünstigte.

Die erfolgreich eingesetzte Methode der BAC-Klonierung ist in Kapitel 2.12 beschrieben und basiert auf einer DNA-Isolierung nach BENDAHMANE *et al.* (1997). Abbildung 3.5.1 zeigt einen Überblick über die Teilschritte der BAC-Klonierung. Nach Präelektrophorese und Partialrestriktion mit *HindIII* wurde eine zweifache Größenselektion durchgeführt. Der DNA-Größenbereich von 150 kb bis 250 kb lieferte nach Ligation und Transformation BAC-Klone mit einer gewünschten durchschnittlichen Insertionsgröße von über 100 kb.

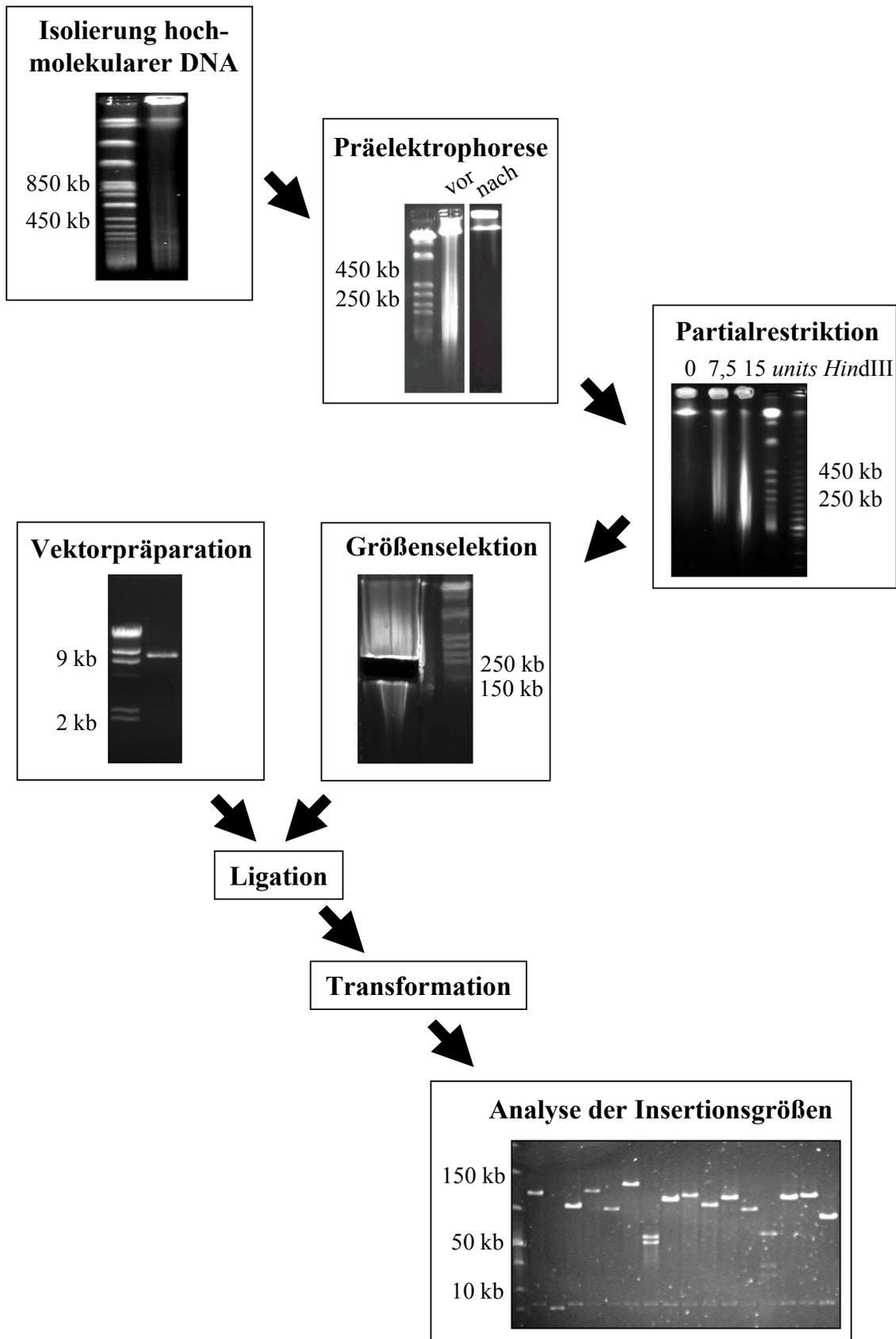


Abbildung 3.5.1: Überblick über die Zwischenschritte der BAC-Klonierung.

Testtransformationen ergaben, dass je Mikroliter Ligation ca. 20 bis 100 Klone erhalten wurden. Der Anteil blauer Kolonien (ohne Insertion) lag je nach Vektorpräparation zwischen einem und zwei Drittel. Da je Mikroliter Ligation nur relativ wenige BAC-Klone erhalten wurden, wurden viele Ligationsansätze durchgeführt und transformiert.

Die Blau/Weiß-Färbung der Klone auf den Transformationsplatten war unterschiedlich stark ausgeprägt. Beim Picken musste deshalb zum Teil mit geringer Selektivität gearbeitet werden, d.h. viele blaue Kolonien wurden mitgepickt. Zur Eliminierung dieser wurden die entsprechenden Mikrotiterplatten auf selektivem Medium ausgestempelt und erneut gepickt. Die verdichtete BAC-Bank ist in 150 384 *well*-Mikrotiterplatten organisiert und enthält 57.600 Klone.

3.5.1 Charakterisierung der BAC-Bank

Zur Charakterisierung der BAC-Bank wurden die durchschnittliche Insertionsgröße, der Anteil von nicht-wachsenden bzw. blauen Klonen und der Anteil von Klonen mit mitochondrialer bzw. plastidärer DNA bestimmt.

Zur Bestimmung der durchschnittlichen Insertionsgröße wurden 184 BAC-Klone analysiert. Die individuellen Insertionsgrößen wurden durch *NotI*-Restriktion und anschließender Pulsfeldgelelektrophorese (Abbildung: 3.5.1.1) bestimmt. Die Größenverteilung der BACs ist in Abbildung 3.5.1.3 dargestellt. Die Insertionen variierten zwischen 0 kb (ohne Insertion) und ca. 230 kb. Die Durchschnittliche Insertionsgröße betrug 114 kb.

Aus der durchschnittlichen Insertionsgröße und Klonzahl (57.600) errechnen sich für die BAC-Bank mit einer angenommenen Genomgröße der Zuckerrübe von 758 Mb (ARUMUGANATHAN & EARLE, 1991) 8,66 Genomäquivalente. Unter Berücksichtigung der nicht-wachsenden und blauen Klone (Tabelle 3.5.1.1) korrigiert sich die Genomabdeckung auf 8,49. Die Wahrscheinlichkeit, eine bestimmte Genom-Sequenz in der Bank aufzufinden, ist damit größer als 99,9 %. Zur Berechnung der Wahrscheinlichkeit wurde die Formel

$$N = \frac{\ln(1 - P)}{\ln(1 - L / M)}, \text{ wobei } N \text{ die Anzahl der Klone, } L \text{ die durchschnittliche}$$

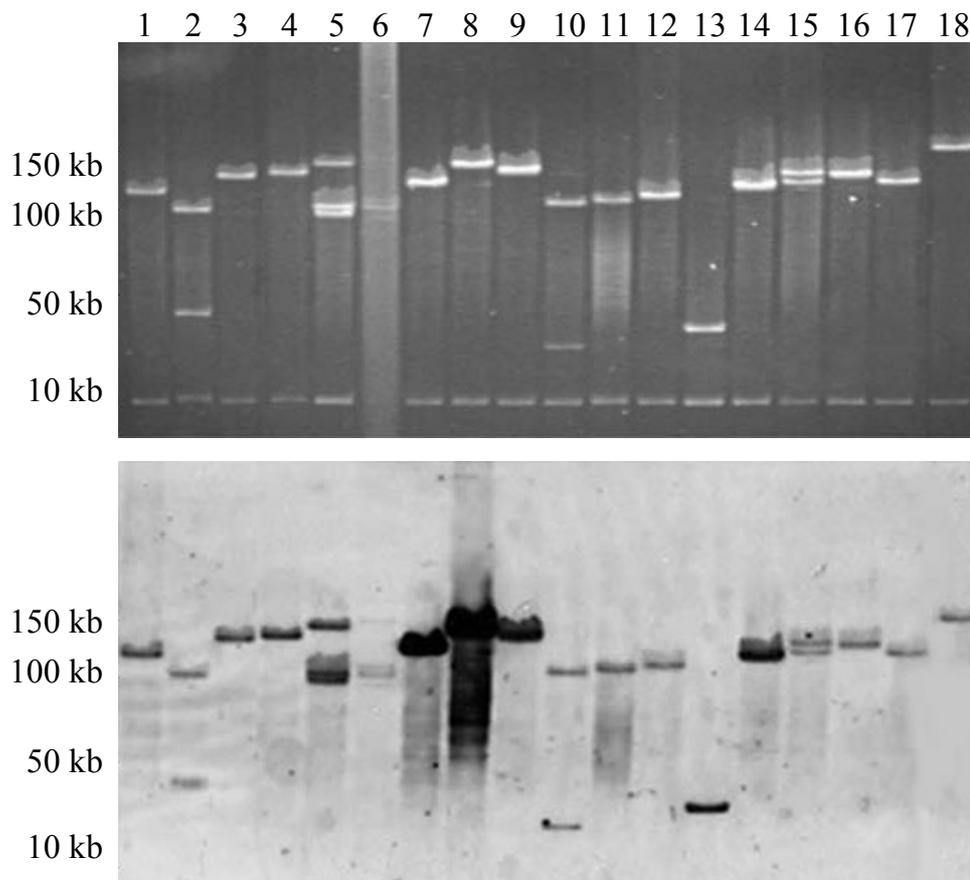


Abbildung 3.5.1.1: Insertionsgrößenbestimmung durch Pulsfeldgelelektrophorese nach *NotI*-Restriktion (oben) und nicht-radioaktive SOUTHERN-Hybridisierung mit Zuckerrüben-Gesamt-DNA (KWS2320, unten). 1-18: individuelle BACs. Expositionsdauer: 10 Sek.

Insertionsgröße, P die Wahrscheinlichkeit und M : Genomgröße ist (CLARK & CARBON, 1976).

Die nähere Charakterisierung der BAC-Bank erfolgte an acht 384 *well*-Mikrotiterplatten. Die 3072 Klone entsprechen 5,3 % der Bank. Die gewählten Platten waren die Nummern 1, 21, 41, 61, 81, 101, 121 und 141. Drei Klone (0,1 %) wuchsen auf Indikatorplatten nicht an. Der Anteil blauer Klone lag bei 2,1 % (64 Klone).

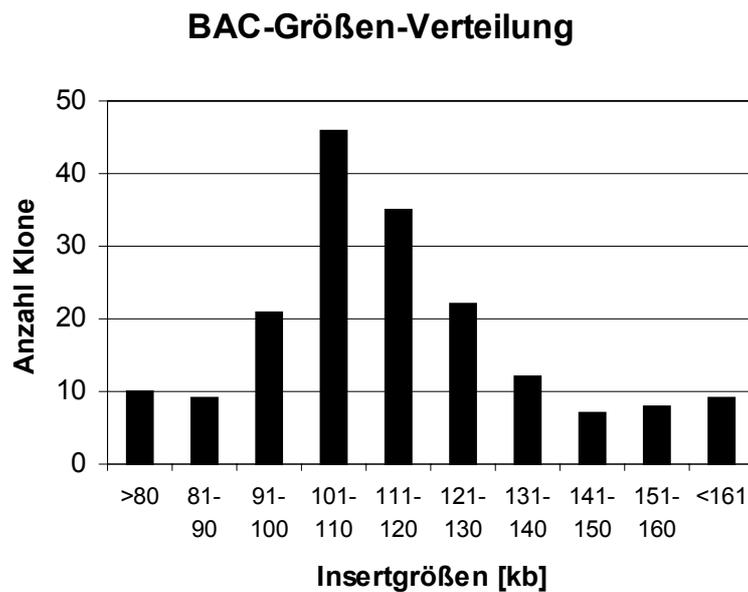


Abbildung 3.5.1.2: Größenverteilung der BACs. Die durch *NotI*-Restriktion ermittelten Insertionsgrößen sind in 10 kb-Gruppen zusammengefasst. Analysiert wurden 184 BACs.

Zur Ermittlung der Anteile von mitochondrialer und plastidärer DNA, sowie von rDNA tragenden Klonen wurden hoch-dichte Filtermembranen im 4x4 *double offset* von den acht ausgewählten Mikrotiterplatten erstellt. Je ein Klon (0,03 %) wurden von der mitochondrialen Testsonde *coxI* (HIESEL *et al.*, 1987) bzw. von der plastidären Testsonde pXX1.6 (SHINOZAKI *et al.*, 1986) detektiert. Eine 23S-rDNA-Sonde (205-498Rsa, KRUPINSKA, 1992) detektierte 40 Klone (1,3 %).

Tabelle 3.5.1.1: Charakterisierung der BAC-Bank. 3072 BAC-Klone wurden untersucht.

Der Anteil der mitochondrialen, plastidären DNA und 23S-rDNA tragenden Klone wurde mit Hilfe der angegebenen Sonden durch Testhybridisierungen bestimmt.

Klone	Sonde	Anzahl	Anteil an der Bank in %
gesamt getestet		3072	
nicht-wachsend		3	0,1
blau (ohne Insertion)		64	2,1
mitochondriale DNA	<i>coxI</i> aus <i>Oenothera</i>	1	0,03
plastidäre DNA	<i>ndhA</i> aus Tabak	1	0,03
rDNA	23S-rDNA aus Gerste	40	1,3

4 Diskussion

Das Schossgen wurde in der spaltenden Population 960701 mit Hilfe von AFLP-Markern genetisch feinkartiert (EL MEZAWY, 2001). Zur Kartierung wurden 775 F₂-Individuen untersucht. In einem das Schossgen umfassenden Intervall von 5 cM wurden 15 AFLP-Marker lokalisiert. Aufbauend auf die genetische Karte von EL MEZAWY (2001) und der eng gekoppelten AFLP-Marker wurde in dieser Arbeit eine physikalische Karte der Region des Schossgens erstellt, die als Grundlage für eine Karten-gestützte Klonierung des Schossgens dient.

Eine Anordnung von Markern in einem (sehr) engen genetischen Bereich ist auf Grund der Algorithmus-gestützten Erstellung der genetischen Karte mit Unsicherheiten behaftet. Daher wird in solchen Fällen eine Anordnung von Rekombinationen zur Festlegung der Markerreihenfolge empfohlen. Eine entsprechende „Marker-Karte“ durch Anordnen von Rekombinationen wurde erstellt und basiert auf den Markerdaten der AFLP-Kartierung.

4.1 Sichten der YAC-Bank

Die YAC-Bank der Zuckerrübenlinie A906001 (KLEINE, 1993) wurde mit AFLP-Markern und von klonierten YAC-Enden abgeleitete Sonden (*chromosome walking*) gesichtet. Das Verfahren, eine YAC-Bank mit AFLP-Markern unter Verwendung von Pools zu sichten, wurde von SIMONS *et al.* (1997) beschrieben. Zum effektiven Sichten wurde in dieser Arbeit das AFLP-Protokoll an die Verwendung von Pools angepaßt, wobei die kleine Genomgröße der Hefe und das Poolen von bis zu 96 Klonen (eine Mikrotiterplatte) berücksichtigt wurden.

Durch das Poolen von bis zu 96 YAC-Klonen verstärkte sich die Intensität der von Hefe stammenden Fragmente im Vergleich zu YAC-spezifischen Fragmenten. Auf Grund der begrenzten Auftrennungskapazität des Polyacrylamid-Gels zeigten sich diese Banden nicht wie normal als „schmale Streifen“, sondern „schmierten“ über einen Bereich von bis zu zehn Basenpaaren, was dazu führte, dass z.T. AFLP-Marker nicht zum Sichten verwendet werden konnten.

Nur neun von 29 „positiven“ Mikrotiterplatten-Pools wurden mit den Zeilen-/Spalten-Pools und auch als Einzelklon verifiziert. Die geringe Verifikationsrate (31 %) der Mikrotiterplatten-Pools mit Hilfe der Zeilen-/Spalten-Pools beruht auf der schwierigen Auswertung der

AFLP-Analysen der Mikrotiterplatten-Pools. Die Signale eines Klons in einem Mikrotiterplatten-Pool sind im Vergleich zu den Hefe-Amplifikaten schwach. Durch das Poolen von je 96 Klonen war ein Hintergrund (bzw. Hintergrundbanden) auf den AFLP-Gelen zu sehen. Diese schwachen Hintergrundbanden, die nicht immer in allen Gelspuren auftraten bzw. die gleiche Intensität besaßen, wurden zum Teil als „Positive“ bewertet. Die geringere Poolgröße der Zeilen- und Spalten-Pools resultierte im Vergleich zu den Hefe-Amplifikaten in einer relativen Verstärkung der spezifischen AFLP-Bande. Zusätzlich wurden Artefakte bzw. Falsch-Positive leichter erkannt, da eine doppelte Kontrolle vorhanden war: je ein Zeilen- und Spalten-Pool mußte die entsprechende AFLP-Bande aufweisen. Die sichere Identifizierung spiegelt sich auch in der 100 %igen Verifikationsrate der Zeilen-/Spalten-Ergebnisse durch die Einzelklon-Analyse wider.

Die neun mit AFLP-Markern identifizierten YACs entsprechen nur ca. einem Viertel der Klone, die nach den Parametern (Insertionsgröße, Klonzahl) der YAC-Bank zu erwarten (ca. 40 YACs) waren. Für das *chromosome walking* wurden 17 von klonierten YAC-Enden abgeleitete Sonden verwendet. Auf Einzelklon-Ebene wurden 25 Überlappungen detektiert, was ca. 75 % der Erwartungen entspricht.

Als Ursache für die große Abweichung zwischen der Erwartung und den tatsächlich gefundenen Werten sind mehrere Möglichkeiten denkbar.

Das Sichten wurde mit dominanten Markern durchgeführt, bei der als Methodik die PCR zum Einsatz kam. Die Amplifikationsreaktion ist bekanntlich störanfällig. Die Gefahr einer Störung sollte mit der Poolgröße steigen, da durch das Poolen die Konzentration potentiell störender Bestandteile relativ zur YAC-DNA ansteigt. Ein Ausfall einer nur dominant auszuwertenden Amplifikation hat somit zur Folge, dass „Positive“ nicht erkannt werden.

Die Erwartungswerte stützen sich auf eine gleichmäßige Verteilung der YACs über das Gesamtgenom. Durch eine ungleichmäßige Verteilung von Restriktionsschnittstellen im Genom sind möglicherweise einige Genombereiche schwerer zu klonieren (T. ALTMANN, pers. Mitteilung), und somit in der Bank unterrepräsentiert. Aus dem oben genannten Grund wird empfohlen, eher zwei kleinere Banken mit verschiedenen Restriktionsenzymen als eine große Bank mit einem Restriktionsenzym zu erstellen (T. ALTMANN, pers. Mitteilung).

Ein statistischer Ansatz zur Ermittlung der Erwartung ist für eine kleine Bank, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurde, nicht sinnvoll, da für statistische Betrachtungen ein größerer Stichprobenumfang (hier: Genomabdeckung) nötig ist.

Eine weitere Ursache für die deutlich hinter den Erwartungen zurückgebliebenen Ergebnisse ist wohl eine Überschätzung der Größe der YAC-Bank. Hinweise hierauf wurden bei Hybridisierungen mit *single copy*-Sonden erhalten, bei denen nur ein bis zwei Klone je Sonde gefunden wurden (M. KLEINE, pers. Mitteilung), während im Durchschnitt zwei erwartet wurden. Zusätzlich wurde in dieser Arbeit bei der Anzucht der YAC-Klone beobachtet, dass etwa jeder achte Klon nicht wuchs. Auch unter Berücksichtigung der kleineren YAC-Bank bleiben die Ergebnisse hinter den Erwartungen zurück.

Das Sichten von *large insert library* mit AFLP-Markern ist in der Literatur wenig beschrieben. CNOPS *et al.* (1996) verwendeten klonierte AFLP-Fragmente zum Sichten einer YAC-Bank und identifizierten den Arabidopsis-Locus TRN1 durch *chromosome landing*. Ein direktes Sichten einer YAC-Bank mittels der AFLP-Technik wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben. Eine Analyse von BAC-Pools mit Hilfe der AFLP-Methode wurde von KLEIN *et al.* (2000) beschrieben. Sie erstellten eine physikalische Karte von *Sorghum* durch AFLP-*fingerprinting*-Analysen von BAC-Pools verschiedener Matrices. Die Mehrzahl der Autoren verwenden zum Sichten von YAC-Banken RFLPs (z. B. BROMMONSCHENKEL & TANKSLEY, 1997; GORMAN *et al.*, 1996; GIOVANNONI *et al.*, 1995; SCHUMACHER *et al.*, 1995).

Chromosome walking mit AFLP-Markern wurde von SIMONS *et al.* (1998) beschrieben. Die AFLP-Marker wurden durch AFLP-*fingerprinting*-Analysen mit Primern mit geringer Selektivität (selektive Basen) erzeugt. Nach Erhöhung der Selektivität wurden diese zum *chromosome walking* eingesetzt. Eine genetische Kartierung dieser Marker eröffnet die Möglichkeit neue eng gekoppelte Marker zum Zielgen zu identifizieren.

4.2 Analyse der isolierten YAC-Klone

Die Insertionsgrößen der YACs variierten zwischen 40 und 330 kb. Der Durchschnitt lag bei ca. 150 kb und liegt damit in dem Bereich des für die YAC-Bank ermittelten Wertes (ca. 130 kb, KLEINE, 1993).

Der Klon Y67G1 zeigte auf einem Pulsfeldgel zwei YACs (100 kb und 150 kb). Ursache dafür kann eine allerdings selten vorkommende zeitgleiche Transformation einer Hefe-Zelle mit zwei YAC-Konstrukten sein. Alternativ kann es sich um ein Gemisch zweier individueller YAC-Klone handeln.

Das Vorhandensein von zwei YACs kann auch auf eine Instabilität der YAC-Insertion hindeuten. Umordnungen und Instabilitäten sind bei YACs beschrieben (Eyers *et al.*, 1992; Schmidt *et al.*, 1994). Die der Isolierung der YAC-Enden werden dabei gleiche Enden erwartet, da die Umordnungen/Instabilitäten meist auf die Insertion begrenzt ist. Dies wurde bei der Untersuchung von Y67G1 nicht beobachtet. Durch Hybridisierung mit Y89F10R wurde gezeigt, dass nur die 150 kb große Bande mit dem durch den gleichen AFLP-Marker identifizierten Klon Y89F10 überlappt.

Mit Hilfe der genetischen Lokalisation der YAC-Enden wurde versucht, die Lage und Orientierung der YACs zu bestimmen und chimäre Klone zu identifizieren. Für sieben YAC-Enden wurde die Lage in der Region des Schossgens bestätigt. Zehn YAC-Enden enthielten repetitive Sequenzen und konnten nicht kartiert werden. Die zwei Enden Y67G1R und Y89F10R waren auf allen getesteten Enzymen monomorph, was auf chimäre Klone hinweist. Die *chromosome walking*-Ergebnisse zeigten aber Überlappungen zwischen Y67G1 und dem Ende Y89F10R bzw. Y89F10 und dem Ende Y67G1R an, was zusammen mit der Identifikation dieser beiden YACs durch den gleichen AFLP-Marker gegen chimäre YACs spricht. Somit wurde keiner der untersuchten YACs als chimär identifiziert. Der Anteil chimären Klone in der untersuchten YAC-Bank liegt bei ca. 10 % (M. KLEINE, pers. Mitteilung).

Eine Subklonierung von YACs eröffnet die Möglichkeit, weitere Sonden zur genetischen Kartierung zu erhalten. Zusätzliche genetische Marker führen nicht nur zur Verbesserung der genetischen Karte, sondern können auch Aufschlüsse geben über chimäre Klone, die die Erstellung der physikalischen Karte erschweren. BROMMONSCHENKEL & TANKSLEY (1997) demonstrierten durch genetische Feinkartierung von YAC-Enden und internen YAC-Sequenzen die erfolgreiche Karten-gestützte Klonierung von Sw5 in Tomate. Eine genetische Kartierung von YAC-spezifischen AFLP-Fragmenten (*AFLP-fingerprinting*) wie es von SIMONS *et al.* (1997) durchgeführt wurde, könnte zusätzliche Informationen über die Lokalisation der YACs geben und zu weiteren mit dem Schossgen eng gekoppelten Markern führen.

Bei Vergleichen der Endsequenzen mit Datenbanken pflanzlicher Sequenzen zeigten sechs Endklone Homologien zu repetitiven Motiven – vor allem Retrotransposons. Nach Hybridisierungsergebnissen waren zwölf Endsequenzen repetitiv. Der hohe Anteil an repetitiven YAC-Enden war bei der Zuckerrübe, die mehr als 63 % repetitive Sequenzen (FLAVELL *et al.*, 1974) enthält, zu erwarten. Der Anteil repetitiver DNA im Pflanzenreich variiert zwischen 40 % bei *A. thaliana* (LEUTWEILER *et al.*, 1984) und 95 % bei *Allium cepa* (FLAVELL *et al.*, 1974).

Der überwiegende Teil der homologen Sequenzen stammten von *Arabidopsis thaliana*, deren Sequenzanteil in den Datenbanken auf Grund der Genomsequenzierung sehr hoch war. Homologien zu bekannten Genen aus *A. thaliana*, die an der Blütenformation oder an der Blühzeitbestimmung (z. B. KOORNEEF *et al.*, 1991; LEVY & DEAN, 1998) beteiligt sind, wurden nicht gefunden. Bei einer Analyse der genetischen und physikalischen Lokalisation der homologen Sequenzen auf den fünf Arabidopsis-Chromosomen konnte kein einzelner Bereich ermittelt werden, der zur Region des Schossgens als synthänisch anzusehen war.

Im Rahmen des EuDicotMap-Projekts wurden Untersuchungen zur Synthänie zwischen *Arabidopsis thaliana* und der Zuckerrübe mit ESTs (*expressed sequence tag*) durchgeführt (DOMINGUEZ *et al.*, 2001; I. DOMINQUEZ, pers. Mitteilung). Die Bereiche mit Synthänie waren eher klein und für Kopplungsabschnitte von Zuckerrüben wurden zum Teil mehrere synthänische Regionen in *A. thaliana* gefunden. Wieder andere Regionen schienen aus Duplikationen hervorgegangen zu sein.

Die zwei *A. thaliana*-Blühgene *FRI* (*FRIGIDA*, JOHANSON *et al.*, 2000) und *FCA* (MACKNIGHT *et al.*, 1997) wurden als mögliche Orthologe des Schossgens der Zuckerrübe (LEVY & DEAN, 1998) näher untersucht. Bei Hybridisierungen zeigte *FCA* keine Differenzierung zwischen homozygot einjährigen (*BB*) und homozygot zweijährigen (*bb*) Zuckerrüben, während für *FRI* trotz geringer Spezifität keine homologen Signale auftraten.

Für zwei YAC-Enden wurden potentielle Leserahmen gefunden. Y81D10L enthielt einen potentiellen Leserahmen von über 800 bp Länge. Dieser wies keine Homologien zu bekannten Genen oder Leserahmen unbekannter Funktion auf. Der Leserahmen des Endes Y102H12R zeigte starke Homologien zu einer mitochondrial prozessierenden Peptidase. Eine

Mitwirkung dieses Gens in der Blühzeit-Determination oder der Blütenformation ist bisher nicht beschrieben.

Das YAC-Ende Y89F10R wies auf Nukleotid-Ebene über einen Bereich von etwa 300 bp Homologien zu den beiden Licht-regulierten Genen GTL1 und GTL2 aus *A. thaliana* auf. Ein potentieller Leserahmen wurde aber nicht gefunden. GTL1 und GTL2 kodieren für 1-Aminocyclopropan-1-Carboxylat-Synthasen (ACC). ACC1 wird eine Rolle in der entwicklungsabhängigen Kontrolle der Ethylen-Synthese zugeordnet (VAN DER STRAETEN *et al.*; 1992; SMALLE *et al.*, 1995).

4.3 Entwicklung von STS-Markern

Für das YAC-Ende Y29B6R konnte ein dominanter PCR-gestützter Marker abgeleitet werden, der spezifisch für das zweijährige Allel *b* ist. Bei der Bewertung des Markers, der mit mindestens 2 cM Distanz zum Zielgen kartiert wurde, muss der dominante Charakter berücksichtigt werden. Da eine PCR störanfällig ist, besteht vor allem bei dominanten Markern die Gefahr von falschen Bonituren auf Grund von fehlgeschlagener Amplifikation. Die Position des Markers ist damit eventuell dichter am Schossgen, als nach der ersten Kartierung zu erwartet ist.

Für die YAC-Enden Y73G8L, Y89F10L und Y102H12R wurden codominante STS-Marker entwickelt. Zur sicheren Detektion der Marker Y73G8L und Y89F10L ist eine aufwendigere Analyse erforderlich. Die 15 bp-Deletion (Y73G8L) muss auf einem hochprozentigem Gel (z. B. Polyacrylamid) erfolgen, während der Basenaustausch innerhalb des Markers Y89F10L in Form einer SNP-Analyse (z. B. Heteroduplex- oder *single strand conformation polymorphism*-Analyse) erfolgen kann.

Für den praktischen Einsatz (Züchtung) ist der entwickelte Marker für Y102H12R am geeignetesten, da er codominant und mit einfacher Ausstattung (PCR und Agarose-Gel) detektierbar ist. Weiterhin spricht die sehr enge Kopplung (0 cM) zum Schossgen, die in einer genetischen Kartierung (N=232) ermittelt wurde, für den praktischen Einsatz.

Somit wurden vier YAC-Enden in PCR-gestützten Markern umgewandelt, die eine Marker-gestützte Selektion in der Züchtung oder eine Qualitätskontrolle von Saatgut erlauben sollten.

Die Ergebnisse der Feinkartierung lassen erwarten, dass der Bereich des Schossgens durch diese Marker vollständig abgedeckt wird. Weitere Marker können noch von den klonierten YAC-Enden abgeleitet werden. Die in dieser Arbeit entwickelten Marker haben gegenüber den von EL MEZAWY (2001) klonierten AFLP-Markern den Vorteil, dass sie PCR-gestützt durchgeführt werden können. Auf Grund der kurzen AFLP-Fragmente ist es meist schwierig Sequenzunterschiede auf diesen Fragmenten zu identifizieren. Durch inverse PCR lassen sich allerdings zusätzliche Sequenzinformationen gewinnen, die die Entwicklung von PCR-Markern erleichtern. Die AFLP-Marker von EL MEZAWY (2001) haben gegenüber dem PCR-Marker Y29B6R den Vorteil, dass sie das in der Zuckerrüben-Züchtung wichtigere einjährige Allel detektieren.

4.4 Erstellung einer physikalischen Karte

Zur Erstellung einer physikalischen Karte der Region des Schossgens wurden AFLP-*fingerprinting*- und *chromosome walking*-Experimente durchgeführt. Als zusätzliche Informationen wurden Daten der AFLP-Feinkartierung (EL MEZAWY, 2001) herangezogen.

Die Relation zwischen genetischer und physikalischer Distanz konnte durch die zwei YACs Y5C6 und Y102H12 geschätzt werden, die durch jeweils zwei AFLP-Marker identifiziert wurden. Mit Hilfe der Markerpositionen aus der AFLP-Feinkarte des Schossgens (EL MEZAWY, 2001) ließ sich das Verhältnis der physikalischen zur genetischen Distanz in der Region des Schossgens zu 40 kb/cM (Y5C6) bzw. 130 kb/cM (Y102H12) bestimmen. Bei der Bewertung dieses Ergebnisses muß berücksichtigt werden, dass entgegen der Ergebnisse des *chromosome walkings* laut genetischer Kartierung der YAC Y5C6 vollständig von dem YAC Y102H12 überlappt wird. Eine alternative Abschätzung der Relation kann durch die maximale Distanz (5 cM) der YAC-identifizierenden AFLPs (p18_b438 und p15_b090) und der Gesamtlänge der mit Hilfe der YACs isolierten Zuckerrüben-DNA (ca. 2 Mb) erfolgen. Danach entsprechen ca. 400 kb physikalische Länge einem Centi-Morgan genetischer Distanz.

Zur Ermittlung der Relation von genetischer und physikalischer Distanz kann neben dem Vergleich der genetischen und physikalischen Karte eine Pulsfeldgel-Kartierung durchgeführt werden. GIOVANNONI *et al.* (1995) schätzten mit dieser Methode die Relation im Bereich der

Tomaten-Gene *rin* und *nor* auf 200-300 kb/cM bzw. 200 kb/cM. SCHUMACHER *et al.* (1995) bestimmten die physikalische Distanz der flankierenden Marker des *ls*-Locus der Tomate auf maximal 375 kb. Die physikalische Distanz der flankierenden Marker des QTLs *fw2.2* der Tomate wurde von ALPERT & TANKSLEY (1996) durch Pulsfeldgel-Kartierung bestimmt (≤ 150 kb entspricht 0,13 cM).

Bei den AFLP-*fingerprinting*-Experimenten zeigte sich, dass mehrere Banden in mehreren YACs (bis zu sieben von acht) vorkamen, was auf Überlappungen hinwies. Die übrigen AFLP-Daten ließen es aber nicht zu, die betreffenden YACs ohne Widersprüche anzuordnen. Eine mögliche Erklärung dieser nicht einzuordnenden Banden ist, dass sie repetitiven Ursprungs sind. Dies würde bedeuten, dass sie häufig im Zuckerrüben-Genom - damit auch in mehreren YACs - vorkommen, aber nicht zu einem genetischen Locus gehören. Dass sich hinter AFLP-Banden repetitive Sequenzen verbergen können, wurde in der Literatur schon beschrieben (REAMON-BÜTTNER *et al.*, 1999; CHO *et al.*, 1996).

Der *contig* wurde überwiegend aus den Daten der *chromosome walking*-Experimente erstellt. Die AFLP-*fingerprinting*-Daten wurden zur Abschätzung der Größe der Überlappungen verwendet. Das Ziel, einen einzelnen *contig*, der das Schossgen umschließt, zu erstellen, wurde nicht erreicht. Die zwölf aus der YAC-Bank isolierten Klone ließen sich nur lückenhaft zu einer physikalischen Karte zusammenfügen (Abbildung 3.4.1).

Auf Grund der vielen repetitiven YAC-Enden war es nicht möglich, alle Überlappungen von beiden Seiten zu bestätigen. Viele Überlappungen sind nur einseitig bestimmt, so sind z. B. die Klone Y49F7 und Y85A6 nur durch einen Verbindungspunkt in den *contigs* integriert. Die fehlenden *chromosome walking*-Daten könnten Aufschluß über chimäre Klone und Fehler in der Analyse geben. Die Erstellung der physikalischen Karte könnte durch Sonden von internen YAC-Sequenzen unterstützt werden.

Ein Vergleich der genetischen und physikalischen Karte zeigt, dass die relativen Orientierungen der YACs zueinander und in Relation zum Schossgen nicht geklärt sind. Eine Klärung der Orientierungen kann durch eine Kartierung in einer großen Population oder durch Füllen der *contig*-Lücken erfolgen. Beim Vergleich der Markerreihenfolgen der genetischen und

physikalischen Karte traten einige Widersprüche auf. Zur Angleichung bzw. Festlegung der Markerreihenfolgen sind mehrere Möglichkeiten denkbar:

Um die Auflösung der genetischen Karte zu verbessern und damit die relativen Orientierungen zu bestimmen, wäre eine Kartierung in einer größeren Population notwendig. Sind die zur physikalischen Kartierung verwendeten genomischen Banken (YAC, BAC, PAC) sehr groß, kann eine vorerst „grobe“ bzw. unsichere genetische Karte später mit Hilfe der physikalischen Karte aufgebaut bzw. verbessert werden.

Eine genetische Karte aus „unsicheren“ dominanten Markern (z. B. AFLPs) kann durch zusätzliche Kartierung von einigen codominanten Markern wie z. B. RFLPs deutlich verbessert werden. Die daraus ermittelte genetische Karte gewinnt an Stabilität und Sicherheit (G. KOCH, Dieckmann, Sülbeck, pers. Mitteilung).

Weiterhin sollte berücksichtigt werden, dass die AFLPs codominant ausgewertet wurden. Eine codominante Auswertung der eigentlich dominanten AFLP-Marker beinhaltet die Gefahr von Auswertungsfehlern. Dies zeigte sich auch bei der Anordnung der (sehr) engen AFLP-Marker, die nicht ohne Probleme möglich war. Die Programm-gestützte Anordnung von Markern in einem sehr engen Bereich, wie es bei einer Feinkartierung oder zum *map-based cloning* notwendig ist, ist allgemein schwierig bzw. unsicher. In einem solchen Fall wird die Anordnung von Rekombinanten einer Programm-gestützten Anordnung zur Ermittlung der Markerreihen-folge vorgezogen (P. SCHULZE-LEFERT, pers. Mitteilung). Die Schwierigkeiten, die engen AFLP-Marker „richtig“ anzuordnen, zeigten sich auch bei der Feinkartierung des Schossgens. Der manuelle Vergleich von AFLP-Daten und der daraus berechneten genetischen Karte (EL MEZAWY, 2001) zeigte mehrere Unstimmigkeiten. Die wahrscheinlichste Anordnung von Markern ist die, bei der die wenigsten Rekombinationsereignisse zur Erklärung der Genotypen notwendig sind. Um die Markerreihenfolge der genetischen Karte sowohl innerhalb einer Pflanze als auch in der untersuchten Population zu erklären, mussten mehr Rekombinations-ereignisse angenommen werden als es bei der manuell erstellten Markeranordnung nötig war. Zusätzlich mussten für die genetische Karte mehr Rekombinationsereignisse angenommen werden, bei denen nur einzelne Marker von den Rekombinationen betroffen waren. Ein Marker lag z. B. im heterozygoten Zustand vor, während die flankierenden Marker den (gleichen) homozygoten

Zustand aufwiesen (z. B. ...BHB...). Solche Doppelrekombinationen sind in einem genetisch engen Bereich selten. Einen weiteren Hinweis auf eine fehlerhafte Markerreihenfolge der genetischen Karte geben die Ergebnisse des *chromosome walkings*. Lt. genetischer Karte überlappen die YACs Y5C6 und Y102H12, während mit den Ergebnisse des AFLP-*fingerprintings* und des *chromosome walkings* eine Überlappung der Klone nicht nachgewiesen werden konnte. Für die Erstellung der physikalischen Karte wurde daher eine Markerreihenfolge verwendet, die durch eine manuelle Anordnung der Rekombinanten ermittelt wurde.

Die Ergebnisse des Sichtens der YAC-Bank zeigten, dass die verwendete YAC-Bank zu klein war, um für jeden AFLP-Marker bzw. für jedes YAC-Ende entsprechende Klone zu identifizieren. Da die Kartierung des Schossgens mit einigen Unsicherheiten behaftet ist, ist die genaue Lage der YACs innerhalb der physikalischen Karte bisher nicht mit Sicherheit geklärt. Zum Schließen der Lücken wurde eine weitere genomische *large insert*-Bank benötigt, die im Rahmen dieser Arbeit in Form einer BAC-Bank erstellt wurde.

Zur Erstellung von physikalischen Karten werden verschiedenen Methoden angewendet. KURATA *et al.* (1997) verwendeten RFLPs und RAPDs der genetischen Karte zur physikalischen Kartierung des Reis-Genoms. LUMSDEN *et al.* (1999) bildeten aus AFLP-*fingerprinting*-Daten einen YAC-*contig* der Region der Gene ADH2 und MTP beim Schaf, wobei die Überlappungen der YACs anhand der AFLP-*fingerprinting*-Daten abgeschätzt wurden. KLEIN *et al.* (2000) erstellten eine physikalische Karte von *Sorghum* durch AFLP-*fingerprinting* von verschiedenen gepoolten BACs. MOZO *et al.* (1999) konstruierten eine physikalische Karte des *A. thaliana*-Genoms durch Hybridisierungen mit BAC-Endklonen. ZHU *et al.* (1996) kartierten *single copy*-Sonden von YACs durch Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH). GISSELSSON *et al.* (2000) wiesen durch *multifluor* FISH komplexe Chromosom-Abnormalitäten nach. DESEL *et al.* (2001) kartierten ganze YACs durch FISH auf dem Zuckerrüben-Genom.

Ganze YACs, die in dieser Arbeit isolierten YACs wurden, konnten auf Grund des hohen repetitiven Anteils der DNA mit Hilfe der FISH nicht auf dem Zuckerrüben-Genom lokalisiert, während Y73G8L durch FISH centromernah lokalisiert werden konnte (C. DESEL, pers. Mitteilung).

Um die Größen von Lücken in einer physikalischen Karte zu bestimmen, werden Pulsfeldgel-Kartierungen (s.o.) und FISH eingesetzt. FRANSZ *et al.* (1996) zeigten eine hochauflösende physikalische Kartierung von DNA-Sequenzen durch FISH an *extended fibres* bei Tomate und *A. thaliana*. Ein *contig* aus drei Cosmiden (*Arabidopsis*) von insgesamt 89 kb wurde an *extended fibres* analysiert. Die Länge der Überlappungen wurde anhand des Fluoreszenz-signalen bestimmt. Die von FRANSZ *et al.* (1996) verfeinerte Methodik führte zu dem geringen Kondensationsgrad von 3,27 kb/ μm , was eng an die aus dem Watson-Crick-Modell abgeleitete DNA-Länge von 2,9 kb/ μm herankommt. Somit wäre eine relativ genaue Bestimmung der Lücken der physikalischen Karte mit dieser Methode möglich.

4.5 Konstruktion einer Zuckerrüben-BAC-Bank

Da die Erstellung eines vollständigen YAC-*contigs* mit der zur Verfügung stehenden YAC-Bank nicht gelang, wurde es notwendig, eine *large insert*-Bank der Zuckerrübe zu erstellen. Dabei wurde einer Zuckerrüben-BAC-Bank gegenüber einer weiteren YAC-Bank der Vorzug gegeben.

Basierend auf dem Protokoll eines BAC-Kurses bei Herrn Prof. Dr. T. ALTMANN (MPI für molekulare Pflanzenphysiologie, Berlin-Golm) wurden eine Reihe von Versuchen mit verschiedenen Methoden durchgeführt und ausgetestet. Erst nach zwei Jahren gelang der Durchbruch in der BAC-Klonierung. Unter der Anleitung von Herrn E. VAN DER VOSSEN vom „Plant Research International“ in Wageningen (Niederlande) wurde eine weitere BAC-Methodik (s. 2.12) angewendet. Die Wiederholung dieser Methode in Kiel führte zur Erstellung einer Zuckerrüben-BAC-Bank.

Die ersten, auf einen bei T. ALTMANN durchgeführten Kurs basierenden Versuche zur BAC-Klonierung erfolgten mit dem Restriktionsenzym *EcoRI*. Als Vektor diente pBeloBAC-Kan (MOZO *et al.*, 1998), der ein Kanamycinresistenzgen enthält und singuläre Klonierungsstellen für *EcoRI* und *BamHI* besitzt. Aus den vielen durchgeführten Versuchen soll in Zusammenhang mit beschreibender Literatur im Folgenden eine Bewertung der einzelnen Teilschritte zur BAC-Klonierung vorgenommen werden. Im Anschluß wird auf Besonderheiten der erfolgreich eingesetzten Methode eingegangen.

Generell spielen bei der BAC-Klonierung viele unterschiedliche und teilweise schwer kontrollierbare Parameter eine Rolle, so dass die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse z.T. sehr gering ist. Die geringe Reproduzierbarkeit bei BAC-Klonierungen führt dazu, dass Erfolge oft Zufallsresultate sind (T. ALTMANN und H. KAUFMANN, pers. Mitteilung). Welche Parameter hinsichtlich der Zahl und Insertionsgröße der BAC-Klone die entscheidende Rolle spielen, ist unbekannt. KIM *et al.* (1996) hielten die Konzentration, Größe und Integrität der fraktionierten DNA für die wichtigsten Faktoren, betonten aber gleichzeitig, dass diese Faktoren am schwierigsten zu kontrollieren seien. Oft reichen wenige gute Ligationsansätze für die Erstellung einer ganzen BAC-Bank aus. DANESH *et al.* (1998, Soja) und NAM *et al.* (1999, *Medicago*) stellten beispielsweise BAC-Banken aus vier Ligationsansätzen her; MOZO *et al.* (1998, *Arabidopsis*) benötigten drei Ansätze, WOO *et al.* (1994, *Sorghum*) zwei und VINATZER *et al.* (1998, Apfel) nur einen Ligationsansatz.

HMW-DNA-Isolation:

Im Laufe dieser Arbeit wurden verschiedene Methoden zur Isolierung von hochmolekularer DNA durchgeführt. Alle Methoden basierten statt auf einer Protoplasten-Isolation auf einer Chromatin- bzw. Kernextraktion aus gefrorenem Blattmaterial. Die Verwendung von Protoplasten kann unter Umständen HMW-DNA von höherem Reinheitsgrad und in höherer Konzentration liefern, hat aber neben der aufwendigeren Herstellung den Nachteil, dass die gesamte Organellen-DNA mitisoliert wird. Diese kann bei Pflanzen bis zu 35 % der GesamtdNA ausmachen (XOCONOSTLE-CÁZARES *et al.*, 1993). Der Anteil von DNA aus Chloroplasten und Mitochondrien sollte in *large insert libraries* jedoch möglichst gering sein, weil die Organellsequenzen ein *chromosome walking* auf Grund von Homologien mit nukleären Sequenzen in die Irre führen können (ZHANG *et al.*, 1995).

In dieser Arbeit wurde die hochmolekulare DNA in Agaroseblöcke (SCHWARTZ & CANTOR, 1984) statt in *microbeads* (WOO *et al.*, 1995; ZHANG *et al.*, 1995) eingebettet. Für eine Partialrestriktion in *microbeads* wird auf Grund des etwa 1000-fach größeren Oberflächen-Volumen-Verhältnisses (ZHANG, 1999) eine geringere Enzymaktivität als in Agaroseblöcken benötigt. Die DNA-Konzentration in *microbeads* ist jedoch normalerweise geringer als in Blöcken (VANHOUTEN & MACKENZIE, 1999) und der Arbeitsaufwand unverhältnismäßig

hoch (S. M. REAMON-BÜTTNER, pers. Mitteilung). Die meisten Autoren verwenden daher Agarose-blöcke (ANAND, 1986; WANG *et al.*, 1995).

Präelektrophorese:

Eine Präelektrophorese der Agaroseblöcke vor der Partialrestriktion erwies sich besonders bei Isolationen mit einem hohen Anteil von degradierter DNA als sinnvoll, weil sie die Abstufungen der Partialrestriktion bei der Optimierung der Restriktionsbedingungen besser sichtbar machte.

Die ermittelte Optimaldauer lag deutlich unter den Werten, die bislang für Zuckerrüben-DNA empfohlen wurden. So unterwarfen EYERS *et al.* (1992) ihre Protoplasten-Lysate einer Präelektrophorese von vier Stunden; KLEIN-LANKHORST *et al.* (1994) empfahlen fünf Stunden. Wie wichtig eine individuelle Bestimmung der Dauer der Präelektrophorese ist, wurde bei einem Vergleich zwischen verschiedenen DNA-Isolaten deutlich.

Partialrestriktion:

Bei der Partialrestriktion mit *EcoRI* können verschiedene Strategien angewandt werden: Variation der Enzymaktivität bei konstanter Inkubationszeit (BURKE & OLSON, 1991), Konkurrenz zwischen *EcoRI* und *EcoRI*-Methylase (LARIN *et al.*, 1991), Variation der Inkubationszeit bei konstanter Enzymaktivität (ANAND *et al.*, 1989) und Variation der Konzentration des Cofaktors Mg^{2+} (ALBERTSEN *et al.*, 1989). In den mit *EcoRI* durchgeführten Versuchen wurde die Enzymaktivität variiert. Bei einer Inkubationszeit von einer Stunde bei 37°C ergaben sich weitgehend reproduzierbare Partialrestriktionen. Zur Partialrestriktion mußten zwischen 200 und 500 *units EcoRI* je 50 µl-Agarosestück eingesetzt werden. EYERS *et al.* (1992) und KLEIN-LANKHORST *et al.* (1994) mußten bei der Restriktion von aus Protoplasten isolierter HMW-DNA (Zuckerrübe) bei 15 bis 50 *units* lange Inkubationszeiten (4,5 bzw. 6 h) in Kauf nehmen, wovon viele Autoren abraten (ZIMMER & GIBBINS, 1997; SALIMATH & BHATTACHARYYA, 1999; CHOI & WING, 1999). KLEINE (1993) berichtete von HMW-DNA aus Chromotinextraktionen (Zuckerrüben), die ohne Aufschmelzen der schützenden Agarosematrix kaum restringierbar war.

Größenselektion:

Für die BAC-Klonierung werden Restriktionsfragmente in großen Mengen und sehr guter Qualität benötigt, um die geringe Transformationseffizienz großer Plasmide zu kompensieren (LEONARDO & SEDIVY, 1990; SHENG *et al.*, 1995; WANG *et al.*, 1995). Die Größenselektion durch PFGE ist empfindlich gegenüber einer Überladung des Gels. Dies führt zu einer Comigration kleiner Fragmente mit deutlich größeren (SHENG *et al.*, 1995), die mit größerer Effizienz ligiert und transformiert werden. Eine Folge davon ist die Senkung der durchschnittlichen Insertionsgröße (SHENG *et al.*, 1995; OSOEGAWA *et al.*, 1998). FRIJTERS *et al.* (1997) leiteten aus ihren Ergebnissen den Schluss ab, dass die Mehrzahl aller klonierten Fragmente zwischen größeren Molekülen comigriert war. VINATZER *et al.* (1998) berichteten, dass nur mit Restriktionsfragmenten aus einer schmalen Zone des Pulsfeldgels BACs mit akzeptablen Insertionsgrößen kloniert werden konnten. Wo diese Zone lag, war auf Grund konzentrationsabhängiger Größenverschiebungen der Fragmente nicht mit Hilfe des Größenmarkers, sondern nur empirisch zu bestimmen. Entsprechend durchgeführte Experimente mit Zuckerrüben-DNA führten nicht zur Klonierung von BACs.

Eine effektive Größenselektion verringert den Anteil von Kleinfragmenten. Dieses kann durch einfache oder doppelte Größenselektion erfolgen. CAI *et al.* (1995) beobachteten nach einer zweiten Größenselektion eine 6,5-fach geringere Klonierungseffizienz, während die durchschnittliche Insertionsgröße nur um 8 kb stieg. Einige Autoren raten grundsätzlich von einer zweiten Größenselektion ab (WANG *et al.*, 1995; DANESH *et al.*, 1998; VANHOUTEN & MACKENZIE, 1999). CHOI & WING (1999) berichteten, dass die Transformationseffizienz durch eine zweite Größenselektion um 80-95 % sank. Sie hielten eine doppelte Größenselektion nur bei solchen Ansätzen für sinnvoll, die bei einfacher Größenselektion 500 bis 2 000 weiße Klone pro Mikroliter Ligationsansatz lieferten und Insertionen zwischen 50 und 300 kb Länge ermöglichten.

Wiedergewinnung der größtenfraktionierten DNA:

Eine Rückgewinnung der fraktionierten DNA ist sowohl durch Elektroelution (STRONG *et al.*, 1997) als auch durch Agaroseabbau möglich. Bei der Verflüssigung von Agarose wurde GELase[®] verwendet. Beide Enzyme lieferten vergleichbare Ergebnisse. Entgegen der von STRONG *et al.* (1997) beschriebenen Beobachtung war eine Elektroelution hinsichtlich der Integrität der gewonnenen Fragmente nicht geeigneter als eine Gelverflüssigung. Methodisch bedingt ist die DNA-Konzentration im Elektroeluat verdünnter als im verflüssigten Gel. Die Klonierungseffizienz der elektroeluierten Restriktionsfragmente lag unter dem entsprechenden Wert der Gelverflüssigung.

Vektorpräparation:

Einen großen Einfluss auf die BAC-Klonierung hat die Qualität des präparierten Vektors. Die Ausbeute und Qualität des Vektors entsprachen den üblichen Standards. Die Ausbeute lag mit 10-30 µg/l Über-Nacht-Kultur deutlich höher als der publizierte Durchschnitt. LIN *et al.* (1999) erreichten 1,5 µg Vektor-DNA pro Liter Über-Nacht-Kultur; die Standardprotokolle von CHOI & WING (1999) gaben 5-10 µg/l an. Zur Reinigung des Vektors wurde statt der häufig verwendeten Cäsiumchlorid-Gradienten-Zentrifugation (z. B. WOO *et al.*, 1994; YANG *et al.*, 1997; KIM *et al.*, 1996) eine Plasmid-Safe[™] Dnase-Behandlung durchgeführt (MOZO *et al.*, 1998).

Die zur Restriktion und Dephosphorylierung verwendeten Bedingungen lagen im unteren Bereich der empfohlenen Werte, wodurch eine *star activity* von *EcoRI* unwahrscheinlich war. CHOI & WING (1999) sowie ZHANG (1999) rieten zu Enzymaktivitäten zwischen 3 *units*/µg (für 4 Std.) und 10 *units*/µg (für bis zu 24 Std.). Im verwendeten Restriktionsansatz war eine *star activity* von *EcoRI* laut Herstellerangaben praktisch ausgeschlossen (Boehringer, Mannheim).

Eine zu hohe Phosphataseaktivität kann die Vektorenden beschädigen. Drei Phosphatase-Sorten wurden bislang bei BAC-Klonierungen erfolgreich eingesetzt: *Calf Intestine Alkaline Phosphatase* (SALIMATH & BHATTACHARYYA, 1999; ZHANG, 1999), *Shrimp Alkaline Phosphatase* (LIN *et al.*, 1999; NAM *et al.*, 1999) und die am häufigsten verwendete HK[™]

thermolabile Phosphatase (z. B. WOO *et al.*, 1994; DANESH *et al.*, 1998; CHOI & WING, 1999), die in dieser Arbeit verwendet wurde.

Ligation:

Ligationen wurden sowohl mit empirischen als auch mit molar berechneten Verhältnissen von Vektor und fraktionierter DNA durchgeführt. Das empfohlene molare Verhältnis zwischen Insertion und Vektor reicht je nach Objekt von 1:1 (E. VAN DER VOSSEN, pers. Mitteilung) bis 1:15 (CHOI & WING, 1999). Mehrere empirische Ligationsansätze sind unter diesem Gesichtspunkt die verlässlichere Alternative (LIN *et al.*, 1999; T. ALTMANN, pers. Mitteilung).

Hinsichtlich der Konzentration der fraktionierten DNA im Ligationsansatz gibt es unterschiedliche Ansichten. Manche Autoren warnen wegen möglicher Chimärenbildung vor einer zu hohen Konzentration an Restriktionsfragmenten (FRIJTERS *et al.*, 1997), nach der Meinung anderer kann diese nicht zu hoch sein (VINATZER *et al.*, 1998; T. ALTMANN, pers. Mitteilung). Der Anteil an verflüssigter Agarose sollte in der Ligation nicht über ca. 35 % liegen (E. VAN DER VOSSEN, pers. Mitteilung).

Transformation:

Hinsichtlich der optimalen Elektroporationsparameter wurden bekannte experimentelle Befunde bestätigt. Die höchste absolute Klonierungseffizienz, d. h. die größte Menge an klonierter Fremd-DNA wurde wie bei SHENG *et al.* (1995) mit der Standard-Feldstärke von 12,5 kV/cm erreicht, während eine niedrigere Feldstärke (9 kV/cm) zu einer höheren durchschnittlichen Insertionsgröße bei geringerer Klonierungseffizienz führte. Eine weitere Steigerung der absoluten Klonierungseffizienz ist nach neueren Erkenntnissen weniger durch verbesserte Elektroporationsparameter als vielmehr durch einen Konzentrierungsschritt möglich. Eine Präzipitation der BAC-Ligation in Anwesenheit von Hefe-tRNA und anschließende Resuspendierung in einem kleinen Volumen kann die Klonierungseffizienz um das 70-fache steigern (ZHU & DEAN, 1999).

Falsch-Positive:

Das Auftreten falsch-positiver Klone, also weißer Klone ohne Insertion ist ein grundsätzliches Problem der BAC-Klonierung (HAMILTON *et al.*, 1999). Ihr durchschnittlicher Anteil lag in den Versuchen mit *EcoRI* bei 72 %. Der Anteil der Falsch-Positiven in den bisher publizierten BAC-Banken betrug zwischen 2 % (NAKAMURA *et al.*, 1997) und 16 % (NAM *et al.*, 1999). LIN *et al.* (1999) erstellten eine BAC-Bank von *Sorghum propinquum* aus Ligationsansätzen, die zwischen 0 % und 29 % Falsch-Positive hervorbrachten.

Die Entstehung falsch-positiver Klone wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst. So spielt beispielsweise die Art und Effektivität der Größenselektion eine wichtige Rolle. FRIJTERS *et al.* (1997) beobachteten, dass bei Ligationsansätzen mit Restriktionsfragmenten zwischen 400 kb und 800 kb bis zu 75 % der resultierenden Klone falsch-positiv waren. Die Übrigen hatten Insertionen von unter 50 kb Länge. Generell nimmt der Anteil von Falsch-Positiven zu, wenn Klone mit großen Insertionen hergestellt werden sollen, weil die Transformations-effizienz mit steigender Plasmidgröße sinkt (OSOEGAWA *et al.*, 1998).

Solche Beobachtungen decken sich im Wesentlichen mit den Ergebnissen dieser Arbeit. Die Versuche zeigten, dass der Anteil an Falsch-Positiven durch verstärkte Größenselektion anstieg, dass aber auch andere Faktoren wie beispielsweise die Vektorpräparation großen Einfluss auf den Anteil der Falsch-Positiven hatten.

Neben einer aktivitätsabhängigen *star activity* von *EcoRI* können ungünstige Transformationsbedingungen (YANG *et al.*, 1997a), zu hohe Phosphataseaktivitäten beim Dephosphorylierungsschritt (DANESH *et al.*, 1998; LIN *et al.*, 1999) oder wiederholtes Einfrieren und Wiederauftauen des Vektors den Anteil der Falsch-Positiven erhöhen (LIN *et al.*, 1999).

Wege zur erfolgreichen BAC-Klonierung:

Die verwendete Methode zur Isolation von hochmolekularer DNA beinhaltet Filtrationschritte durch Plankton-Netze. Bei anderen Methoden (z. B. Protokolle der Texas A&M Universität und der Clemson Universität) werden die Zellkerne durch Zentrifugationsschritte aufgereinigt. Im Vergleich zur Zentrifugation mit anschließender Rücklösung der Zellkerne

ist die Filtration schonender für die Zellkerne, was sich in der Qualität der isolierten DNA widerspiegelt. Vor der Partialrestriktion wurde eine Präelektrophorese durchgeführt.

Für die Durchführung einer Partialrestriktion sind prinzipiell verschiedene Methoden denkbar (s.o.). In den mit *HindIII* durchgeführten Versuchen wurde die Partialrestriktion durch Variation der Enzymmenge erreicht.

Zur Partialrestriktion mit *HindIII* mussten im Vergleich zu den Experimenten mit *EcoRI* geringere Enzymaktivitäten eingesetzt werden (3-10 *units HindIII* gegenüber 200-500 *units EcoRI*). Der Anteil von Klonen ohne Insertion lag lt. Charakterisierung der mit *HindIII* erstellten BAC-Bank unter einem Prozent (72 % bei *EcoRI*).

Nach zweifacher Größenselektion wurde die Fraktion von 150 kb bis 250 kb zur Klonierung verwendet. Die daraus klonierten BACs hatten eine durchschnittliche Insertionsgröße von 114 kb. Die Diskrepanz zwischen Fraktionsgröße und Klonierungsgröße ist bekannt. Allgemein wird in BAC-Protokollen geraten, eine höher molekulare Fraktion zur Klonierung zu verwenden. Das BAC-Protokoll der Universität Clemson (<http://www.genome.clemson.edu/groups/bac/protocols/protocols2new.html>) rät sogar, die Fraktion von 300 kb bis 500 kb aus dem Gel zu schneiden, da dort klonierbare Fragmente von 50 kb bis 300 kb enthalten sind.

Die Ligation und Transformation folgte weitgehend den in verschiedenen Methoden beschriebenen Parametern. Die Effizienz der Ligationen bzw. Transformationen waren gering. Vergleichbare Werte, die mit Kartoffel-DNA (E. VAN DER VOSSEN, pers. Mitteilung) erzielt wurden, lagen um eine bis zwei Zehnerpotenzen höher. Ursache könnte die Qualität der isolierten hochmolekularen DNA sein. Statt fünf Stunden Präelektrophorese (Kartoffel) konnten mit DNA aus Zuckerrüben nur 2-2,5 Stunden Präelektrophorese durchgeführt werden. Die kürzere mögliche Dauer der Präelektrophorese deutet darauf hin, dass die isolierte hochmolekulare DNA weniger hochmolekular war. Eine weniger hochmolekulare DNA kann auch Ursache für die schlechten Ligations-/Transformationseffizienzen sein.

YANG *et al.* (1997a) beschrieben eine Abhängigkeit der Transformationseffizienz von den Transformationsparametern. Sie erhielten die besten Ergebnisse (Klonzahl, % Rekombinante, Insertionsgröße) mit einem Widerstand von 800 Ω und einer Pulszeit von 15 mSek. Wider-

stände von 100 Ω bis 200 Ω werden üblicherweise laut Literatur (z. B. MOZO *et al.* 1998) verwendet. ZHU & DEAN beschrieben 1999 eine Methode zur Effizienzsteigerung, bei der durch Präzipitation mit tRNA die Transformationseffizienz von BAC-Ligationen um Faktor 70 gesteigert wurde.

Ein entscheidender Punkt bei der BAC-Klonierung ist die Präparation des Vektors. Bei der Präparation ist auf Vollständigkeit von Restriktion und Dephosphorylierung zu achten. Unvollständige Reaktionen führen zu einem hohen Anteil von blauen Klonen, was die Effizienz der Klonierung reduziert und die Selektion der weißen Klone erschwert. Zur Dephosphorylierung wurde die HKTM thermolabile Phosphatase von Biozym, Hess. Oldendorf eingesetzt, die nach Literaturangaben am häufigsten verwendet wurde.

Die erstellte BAC-Bank besteht aus 57.600 Klonen mit einer durchschnittlichen Insertionsgröße von 114 kb. Die durchschnittlichen Insertionsgrößen pflanzlicher BAC-Banken liegen überwiegend zwischen 100 kb und 150 kb (<http://hbz.tamu.edu/bacindex.html>, <http://www.genome.clemson.edu>). Aber auch BAC-Banken mit deutlich kleineren und auch deutlich größeren durchschnittlichen Insertionsgrößen sind erstellt worden (45 kb, *Raphanus sativus*, G. CHAMPAGNE,; 210 kb, Weizen, ZHANG *et al.*, beide: <http://hbz.tamu.edu/bacindex.html>).

Die erstellte Zuckerrüben-BAC-Bank spiegelt etwa 8,5-fache Genomabdeckung wider. Die bisher veröffentlichten pflanzlichen BAC-Banken stellen überwiegend zwischen drei und acht Genomäquivalenten dar, wobei auch pflanzliche Banken mit über 15 Genomäquivalenten erstellt wurden (z. B. *Apis mellifera* [23x], *Cucumis melo* cv. MR1 [19x], Reis [15x], alle: <http://www.genome.clemson.edu>).

Wie bei einer Kernextraktion zu erwarten, ist der Anteil von mitochondrialer und plastidärer DNA gering (< 0,1 %). Die entsprechenden publizierten Werte pflanzlichen BAC-Banken liegen zwischen 0 % (FRIJTERS *et al.*, 1997) und 14 % (WOO *et al.*, 1994).

4.6 Kontrolle des Blühens bei anderen Pflanzen

Der Vorgang des Schossens und Blühens ist nicht nur bei der Zuckerrübe von Interesse. Systematische genetische Untersuchungen zum Blühen wurden an *Arabidopsis thaliana* (KOORNEEF *et al.*, 1998) und der Erbse (WELLER *et al.*, 1997) durchgeführt.

Die Untersuchungen an der Modellpflanze *A. thaliana* sind besonders intensiv. Über 20 spätblühende Mutanten (*late flowering*) sind charakterisiert worden (KOORNEEF *et al.*, 1991; PINEIRO & COUPLAND, 1998). LEVY & DEAN (1998) sind der Auffassung, dass mindestens vier Wege an der Blühregulation bei *A. thaliana* beteiligt sind. Der *floral repression pathway* sorgt möglicherweise dafür, dass die Pflanze nicht vor einem gewissen Alter oder Größe das Blühstadium erreicht. Der *autonomous promotion pathway* wird als dazu antagonistischer Weg angesehen, der im Laufe der Entwicklung dafür sorgt, dass die Repression aufgehoben wird. Weitere zwei Wege leiten Signale der Umwelt weiter. Der *photoperiodic promotion pathway* induziert das Blühen unter induktiven Lichtbedingungen, während der *vernalization promotion pathway* das Blühen nach einer Phase von moderater Temperatur erlaubt.

LAURIE definierte 1997 für Getreide (*cereals*) drei Gengruppen, die das Blühen beeinflussen. Unter *photoperiod response genes* werden die Gene zusammengefaßt, die das Blühen in Abhängigkeit von der Tageslänge regulieren. Der Einfluß von niedriger Temperatur wird durch *vernalization response genes* vermittelt. Von Umwelteinflüssen weitgehend unabhängig sind „*earliness*“-Faktoren.

Mit Hilfe der Blühmutanten von *A. thaliana* wurde versucht ein Regulationsnetzwerk für das Blühen zu erstellen. Die Kombination und Auswertung von mutierten Blühgenen ermöglichte die Erstellung von physiologischen Modellen des Blühens (z. B. PINEIRO & COUPLAND, 1998; LEVY & DEAN, 1998).

Durch die vollständige Sequenzierung des Arabidopsis-Genoms und der intensiven Bearbeitung des Blühvorgangs sind bereits viele, am Blühen beteiligte Gene kloniert und charakterisiert. Eine Übersicht hierzu ist auf der *flowering*-Internet-Seite http://www.salk.edu/LABS/pbio_w/flower_web.html zusammengestellt. Einige der Schlüsselenzyme, die die Blühentwicklung kontrollieren, gehören der MADS-Box-Gruppe der Transkriptionsfaktoren an (LAURIE, 1997).

Das Zeitalter der intensiven Genomanalyse ermöglicht einen genetischen Vergleich (*comparative genetics*) des Blühens zwischen verschiedenen Pflanzen. LAURIE verglich 1997 die Genetik des Blühens von *A. thaliana* mit der bei Getreiden. Im Übersichtsartikel von LEVY & DEAN (1998) wurden den bekannten Blühgenen aus *A. thaliana* mögliche Orthologe anderer Pflanzen zugeordnet. Unter anderem wurde das Schossgen der Zuckerrübe als mögliches Ortholog zu *FCA* eingeordnet, welches das Blühen unabhängig von der Photoperiode fördert. *FCA* ist kloniert und kodiert für ein Protein, das RNA-Bindungsmotive und Protein-Protein-Interaktionsdomänen enthält (MACKNIGHT *et al.*, 1997). *FCA* wird posttranskriptionell reguliert und ist Teil einer transkriptionell-regulatorischen Kaskade. Ein erhöhtes Niveau des *FCA*-Transkripts führt zur früheren Blüte.

Ein weiterer Kandidat als Ortholog des Schossgens der Zuckerrübe sollte das Gen *FRI* (*FRIGIDA*) angesehen werden, welches einen Vernalisationsbedarf hervorruft und das Blühen hemmt. *FRI* ist kloniert und molekular analysiert worden (JOHANSON *et al.*, 2000).

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die beiden Gene *FCA* und *FRI* ortholog zum Schossgen sind und somit zwischen einjährigen (*BB*) und zweijährigen (*bb*) Zuckerrüben differenzieren. Die bisherigen Ergebnisse zeigten keine Differenzierung.

Der Ansatz der vergleichenden Genetik ermöglicht die Klonierung von Orthologen. So wurden z. B. orthologe Sequenzen zu den *A. thaliana*-Genen *FCA* (*A. thaliana*) und *VRN2* (CHANDLER *et al.*, 1996) aus Reis, Erbse und *Brassica napus* bzw. aus Reis und Pappel isoliert (C. DEAN, pers. Mitteilung). Ähnliche Ansätze unter Ausnutzung von Synthänien wurden in der Literatur beschrieben. KILLIAN *et al.* (1997) verwendeten YACs und BACs von Reis zur Isolierung von Markern für die Gene *Rpg1* und *rpg4* aus Gerste. CAVELL *et al.* (1998) beschrieben die Kolinearität einer 30 cM großen Region aus *A. thaliana* mit *Brassica napus*.

Die Klonierungen orthologer Gene zeigen, dass eine Identifizierung des Schossgens der Zuckerrübe mit Hilfe von Untersuchungen zum Blühen anderen Pflanzen insbesondere *A. thaliana* möglich sein sollte.

„... Nevertheless, the overall conclusion would seem to be that gene isolation using a comparative genetic approach is like driving in fog: you have a good chance of getting where you want to go as long as you proceed with caution.“

DAVID A. LAURIE (1997)

4.7 Ausblick

Mit Hilfe der erstellten BAC-Bank sollen die Lücken in der physikalischen Karte aufgefüllt werden. Dazu soll die Bank mit von den klonierten YAC-Enden abgeleiteten Sonden und mit AFLP-Markern gesichtet werden. Die Information aus der somit erstellten physikalischen Karte soll verwendet werden, das Schossgen genetisch genauer zu lokalisieren. Die YACs und BACs, die das engste Intervall der flankierenden Marker überspannen, werden sequenziert. Das Schossgen soll durch Komplementationsversuche mit potentiellen Leserahmen der YACs/BACs identifiziert werden.

Zusätzlich zu dieser Strategie wird eine cDNA-Bank erstellt, die spezifisch für den Sprosskegel ist. Durch Hybridisierung sollen cDNAs identifiziert werden, die auf den engsten YACs/BACs liegen. Nachfolgende Untersuchungen beinhalten die Identifizierung der Vollängen-cDNA und Komplementationsversuche.

5 Zusammenfassung

Die Zuckerrübe weist einen zweijährigen Generationszyklus auf und kommt erst nach einer Vernalisationsperiode zur Blüte, während viele verwandte Wildrüben einjährig sind und somit schon ohne Vernalisation im ersten Jahr schossen und blühen. Das Schossgen (Gen *B*) determiniert das Merkmalspaar „einjährig/zweijährig“. Dabei ist das Allel *B* (Einjährigkeit) vollständig dominant über *b*, das für die Zweijährigkeit kodiert.

Das Schossgen wurde mittels AFLPs in einer spaltenden Population feinkartiert. Aufbauend auf diese Feinkartierung sollte eine physikalische Karte der Region, in der sich das Schossgen befindet, erstellt werden. Die Klonierung soll in Form einer Karten-gestützten Klonierung erfolgen.

Eine Zuckerrüben-YAC-Bank wurde mit 20 eng gekoppelten, *b*-spezifischen AFLP-Markern gesichtet. Insgesamt wurden 9 YACs mit diesen Markern identifiziert. Die YAC-Enden wurden kloniert und sequenziert. Ein Sichten der YAC-Bank mit diesen YAC-Sonden (*chromosome walking*) führte zur Isolierung von drei weiteren, zuvor nicht identifizierten YACs. Die YACs weisen Insertionen von 40 kb bis 330 kb auf.

Die erstellte physikalische Karte basiert auf den Ergebnissen von *chromosome walking* und AFLP-*fingerprinting* der zwölf YACs. Vier Klone konnten nicht in Verbindung mit anderen Klonen gebracht werden. Die verbleibenden acht YACs wurden zu drei *contigs* zusammengefügt. Die *contigs* weisen Längen zwischen ca. 200 kb und 400 kb auf. Ein zusammenhängender *contig* aller zwölf Klone konnte nicht erstellt werden. Die gesamte physikalische Karte ist ca. 2 Mb lang und überspannt eine genetische Distanz von 5 cM. Ob einer der *contigs* das Schossgen überspannt, konnte abschließend nicht geklärt werden.

Zur Ermöglichung einer Marker gestützten Selektion in der Zuckerrüben-Züchtung wurden vier PCR-gestützte Marker von YAC-Endsequenzen abgeleitet, die das Schossgen flankieren. Drei der Marker sind codominant auswertbar, ein Marker detektiert nur das zweijährige Allel *b*. Der codominante Marker Y102H12R cosegregierte in einer Population von 232 Individuen mit dem Schossgen.

Zum Auffüllen der Lücken in der physikalischen Karte der Region des Schossgens war eine weitere *large insert library* nötig. Diese wurde in Form einer Zuckerrüben-BAC-Bank erstellt. Die Klonierung erfolgte mit dem Enzym *HindIII* in den Vektor pBeloBAC11. Die Bank besteht aus 57.600 Klone mit einer durchschnittlichen Insertionsgröße von 114 kb. Sie repräsentiert ca. 8,7 Genomäquivalente. Eine Charakterisierung der Bank ergab, dass der Anteil von mitochondrialer und plastidärer DNA unter einem Prozent lag. Der Anteil Klone ohne Insertion lag bei 2,1 %.

Für die noch ausstehende Klonierung des Schossgens wurden mit dieser Arbeit die wesentlichen Voraussetzungen geschaffen. An diese Arbeit schließt sich das Sichten der BAC-Bank zum Auffüllen der physikalischen Karte an.

6 Summary

Sugar beet is a biennial crop which flowers only after a vernalization period, whereas many related wild beet species are annual plants bolting and flowering without vernalization. The gene for bolting (gene *B*) determines the trait pair 'annual/biennial'. The allele *B* (annual growth) is completely dominant over the allele *b* coding for biennial growth.

The gene for bolting was fine mapped in a segregant population using AFLPs. Based on this fine mapping, a physical map of the region containing gene *B* had to be established in order to prepare a map-based cloning approach.

A sugar beet YAC library was screened using 20 closely linked *b*-specific AFLP markers. For an efficient screening of the YAC library, we used pools of 96 clones. The AFLP protocol was optimized. In total, nine YACs were identified by these markers. The YAC ends were cloned and sequenced. Primer pairs of the YAC ends were developed to screen the YAC library by PCR. For the screening, we used YAC pools. Screening the YAC library by chromosome walking with the YAC ends led to the isolation of three additional YACs which had not been identified previously. The insert lengths ranged from 40 kb to 330 kb (average: 150 kb).

The physical map constructed in this work is based on the results of chromosome walking and AFLP-fingerprinting of the 12 YACs. Four clones could not be linked to other clones. The assembly of the remaining eight clones resulted in three contigs that covered between 200 kb and 400 kb. It was not possible to construct a contig including all clones. In total, the physical map spans about 2 Mb and covers a genetic distance of 5 cM. So far, it could not be clarified whether one of the contigs contains the gene for bolting.

In order to allow map based selection in sugar beet breeding, four PCR based markers were derived from YAC end sequences flanking gene *B*. Three of the markers can be evaluated co-dominantly while one marker detects only the biennial allele *b*. The co-dominant marker Y102H12R co-segregated with gene *B* in a population of 232 individuals.

Since the physical map of the gene *B* region was not contiguous, another large insert library had to be produced. This library was constructed in BACs by cloning *Hind*III fragments into

the vector pBeloBAC11. The resulting BAC library consists of 57,600 clones with an average insert length of 114 kb. It represents about 8.7 genome equivalents. The proportion of clones containing mitochondrial or plastid DNA was below 1 %, 2.1 % of the clones contained no insert.

This work established the fundamentals for cloning of gene *B*. The next step will be filling the contig gaps by screening the BAC library.

7 Literaturverzeichnis

- Abe, J.; Guan, G.P.; Shimamoto, Y. (1997). A marker-assisted analysis of bolting tendency in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Euphytica* **94**: 137-144
- Abegg, F.A. (1936). A genetic factor for the annual habit in beets and linkage relationships. *J Agric Res* **53**: 493-511
- Akkaya, M.S.; Bhagwat, A.A.; Cregan, P.B. (1992). Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. *Genetics* **132**: 1131-1139
- Albertsen, H.M.; Le Paslier, D.; Abderrahim, H.; Dausset, J.; Cann, H.; Cohen, D. (1989). Improved control of partial DNA restriction enzyme digest in agarose using limiting concentrations of Mg⁺⁺. *Nucleic Acids Res* **17**: 808
- Alpert, K.B.; Tanksley, S.D. (1996). High-resolution mapping and isolation of a yeast artificial chromosome contig containing fw2.2: A major fruit weight quantitative trait locus in tomato. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 15503-15507
- Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**: 403-410
- Altschul, S.F.; Stephen, F.; Maden, T.L.; Schäffer, A.A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389-3402
- Anand, R. (1986). Pulsed-field gel electrophoresis: A technique for fractionating large DNA molecules. *Trends Genet.* **2**: 278-283
- Anand, R.; Villasante, A.; Tyler-Smith, C. (1989). Construction of yeast artificial chromosome libraries with large inserts using fractionation by pulsed-field gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* **17**: 3425-3433
- Anderson, C. (1993). Genome shortcut leads to problems. *Science* **259**: 1684-1687
- Antoch, M.P.; Song, E.J.; Chang, A.M.; Vitaterna, M.H.; Zhao, Y.; Wilsbacher, L.D.; Sangoram, A.M.; King, D.P.; Pinto, L.H.; Takahashi, J.S. (1997). Functional identification of the mouse circadian *clock* gene by transgenic BAC rescue. *Cell* **89**: 655-667
- Arondel, V.; Lemieux, B.; Hwang, I.; Gibson, S.; Goodman, H.M.; Somerville, C.R. (1992). Map-based cloning of a gene controlling omega-3 fatty acid desaturation in *Arabidopsis*. *Science* **258**: 1353-1355
- Arumuganathan, K.; Earle, E.D. (1991). Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Molecular Biology Reporter* **9**: 208-218
-

-
- Asakawa, S.; Shimizu, N. (1998). High-fidelity digital hybridization screening. *Genomics* **49**: 209-217
- Barzen, E.; Mechelke, W.; Ritter, E.; Seitzer, J.F.; Salamini, F. (1992). RFLP markers for sugar beet breeding: chromosomal linkage maps and location of major genes for rhizomania resistance, monogerm and hypocotyl colour. *Plant J* **2**: 601-611
- Becker, H. (1993). *Pflanzenzüchtung*. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart
- Becker, J.; Heun, M. (1995). Barley microsatellites: allele variation and mapping. *Plant Molecular Biology* **27**: 835-845
- Bendahmane, A.; Kanyuka, K.; Baulcombe, D.C. (1997). High-resolution genetic and physical mapping of the *Rx* gene for extreme resistance to potato virus X in tetraploid potato. *Theor Appl Genet* **95**: 153-162
- Bender, W.; Spieser, P.M.; Hogness, D.S. (1983). Chromosomal walking and jumping to isolate DNA from the *Ace* and *rosy* loci and the Bithorax Complex in *Drosophila melanogaster*. *J Mol Biol* **168**: 17-33
- Bent, A.F.; Kunkel, B.N.; Dahlbeck, D.; Brown, K.L.; Schmidt, R.; Giraudat, J.; Leung, J.; Staskawicz, B.J. (1994). *RPS2* of *Arabidopsis thaliana*: A leucine-rich repeated class of plant disease resistance genes. *Science* **265**: 1855-1860
- Birnboim, H.C.; Doly, J. (1979). Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-1522
- Bosemark, N.O. (1993). Genetics and breeding. In: *The Sugar Beet Crop* (Cooke DA & Scott RK, Eds.): 66-119, Chapman & Hall, London, U.K.
- Botstein, D.; White, R.L.; Skolnick, M.; Davis, R.W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man by using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* **32**: 314-331
- Boudry, P.; Wieber, R.; Saumitou-Laprade, P.; Pillen, K.; van Dijk, H.; Jung, C. (1994). Identification of RFLP markers closely linked to the bolting gene *B* and their significance for the study of the annual habit in beets (*Beta vulgaris* L.). *Theor Appl Genet* **88**: 852-859
- Boysen, C.; Simon, M.I.; Hood, L. (1997). Fluorescence-based sequencing directly from bacterial and P1-derived artificial chromosomes. *BioTechniques* **23**: 978-982
- Brommonschenkel, S.H.; Tanksley, S.D. (1997). Map-based cloning of the tomato genomic region that spans the Sw-5 tospovirus resistance gene in tomato. *Mol Gen Genet* **256**: 121-126
- Burgers, P.M.; Percival, K.J. (1987). Transformation of yeast spheroplasts without cell fusion. *Anal Biochem* **163**: 391-397
-

-
- Burke, D.T.; Carle, G.F.; Olson, M.V. (1987). Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. *Science* **236**: 806-812
- Burke, D.T.; Olson, M.V. (1991). Preparation of clone libraries in yeast artificial chromosome vectors. *Methods Enzymol.* **194**: 251-270
- Buschges, R.; Hollricher, K.; Panstruga, R.; Simons, G.; Wolter, M.; Frijters, 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
- Cai, D.; Kleine, M.; Kifle, S.; Harloff, H.; Sandal, N.N.; Marcker, K.A.; Klein-Lankhorst, R.M.; Salentijn, E.S.J.; Lange, W.; Stieckema, W.; Wyss, U.; Grundle, F.; Jung, C. (1997). Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugar beet. *Science* **275**: 832-834
- Cai, L.; Taylor, J.F.; Wing, R.A.; Gallagher, D.S.; Woo, S.S.; Davis, S.K. (1995). Construction and characterization of a bovine bacterial artificial chromosome library. *Genomics* **29**: 413-425
- Cai, W.W.; Jing, J.; Irvin, B.; Ohler, L.; Rose, E.; Shizuya, H.; Kim, U.J.; Simin, M.; Anantharaman, T.; Mishra, B.; Schwartz, D.C. (1998). High-resolution restriction maps of bacterial artificial chromosomes constructed by optical mapping. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 3390-3995
- Cai, W.W.; Reneker, J.; Chow, C.W.; Vaishnav, M.; Bradley, A. (1998). An anchored framework BAC map of mouse chromosome 11 assembled using multiplex oligonucleotide hybridization. *Genomics* **54**: 387-397
- Cavell, A.C.; Lydiate, D.J.; Parkin, I.A.; Dean, C.; Trick, M. (1998). Collinearity between a 30.centimorgan segment of *Arabidopsis thaliana* chromosome 4 and duplicated regions within the Brassica napus genome. *Genome* **41**: 62-69
- Chandler, J.; Wilson, A.; Dean, C. (1996). Arabidopsis mutants showing an altered response to vernalization. *Plant J.* **10**: 637-644
- Cho, Y.G.; Blair, M.W.; Panaud, O.; McCouch, S.R. (1996). Cloning and mapping of variety-specific rice genomic DNA sequences: amplified fragment length polymorphisms (AFLP) from silver-stained polyacrylamide gels. *Genome* **39**: 373-378
- Choi, S.S.; Kang, Y.S.; Kim, U.J.; Lee, K.H.; shin, H.S. (1999). Chromosomal localization of ESTs obtained from human liver via BAC-mediated FISH mapping. *Mol Cells* **9**: 403-409
- Choi, S.; Wing, R.A. (1999). The construction of bacterial artificial chromosome libraries. Clemson University Genomics Institute:
http://www.genome.clemson.edu/proto_frame.html
-

-
- Chu, G.; Vollrath, D.; Davis, R.W. (1986). Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. *Science* **234**: 1582-1585
- Chumakov, I.M.; Rigault, P.; Le Gall, I.; Bellane-Chantelot, C.; Billault, A.; Guilou, S.; Soularue, P.; Guasconi, G.; Poullier, E.; Gros, I. *et al.* (1995). A YAC contig map of the human genome. *Nature* **377**: 175-297
- Civardi, L.; Xia, Y.J.; Edwards, K.J.; Schnable, P.S.; Nikolau, B.J. (1994). The relationship between genetic and physical distances in the cloned a1-sh2 interval of the *Zea mays* L. genome. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 8268-8272
- Clark, L.; Carbon, J. (1976). A colony bank containing synthetic hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome. *Cell* **9**: 91-99
- Cnops, G.; den Boer, B.; Gerats, A.; Van Montagu, M.; Van Lijsebettens, M. (1996). Chromosome landing at the Arabidopsis TORNADO1 locus using an AFLP-based strategy. *Mol Gen Genet* **253**: 32-41
- Cohen, D.; Chumakov, I.; Weissenbach, J. (1993). A first-generation physical map of the human genome. *Nature* **366**: 698-700
- Collins, F.S.; Guyer, M.S.; Chakravarti, A. (1997). Variations on a theme: Cataloging human DNA sequence variation. *Science* **281**: 1580-1581
- Coulson, A.; Sulston, J.; Brenner, S.; Karn, J. (1986). Toward a physical map of the genome of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 7821-7825
- Cregan, P.B.; Mudge, J.; Fickus, E.W.; Marek, L.F.; Danesh, D.; Denny, R.; Shoemaker, R.C.; Matthews, B.F.; Jarvik, T.; Young, N.D. (1999). Targeted isolation of simple sequence repeat markers through the use of bacterial artificial chromosomes. *Theor Appl Genet* **98**: 919-928
- Creusot, F.; Fouilloux, E.; Dron, M.; Lafleurriel, J.; Picard, G.; Billault, A.; Le Paslier, D.; Cohen, D.; Chabouté, M.; Durr, A.; Fleck, J.; Gigot, C.; Camilleri, C.; Bellini, C.; Caboche, M.; Bouchez, D. (1995). The CIC library: a large insert YAC library for genome mapping in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **8**: 763-770
- Danesh, D.; Peñuela, S.; Mudge, J.; Denny, R.L.; Nordstrom, H.; Martinez, J.P.; Young, N.D. (1998). A bacterial artificial chromosome library for soybean and identification of clones near a major cyst nematode resistance gene. *Theor Appl Genet* **96**: 196-202
- Desel, C.; Jung, C.; Cai, D.; Kleine, M.; Schmidt, T. (2001). High-resolution mapping of YACs and the single-copy gene Hs1(pro-1) on *Beta vulgaris* chromosomes by multi-colour fluorescence in situ hybridization. *Plant Mol Biol* **45**: 113-122
- Desplanque, B.; Boudry, P.; Broomberg, K.; Saumitou-Laprade, P.; Cuguen, J.; van Dijk, H. (1999). Genetic diversity and gene flow between wild, cultivated and weedy forms of *Beta vulgaris* L. (Chenopodiaceae), assessed by RFLP and microsatellite markers. *Theor Appl Genet* **98**: 1194-1201
-

-
- Ding, Y.; Johnson, M.D.; Colayco, R.; Chen, Y.J.; Melnyk, J.; Schmitt, H.; Shizuya, H. (1999). Contig assembly of bacterial artificial chromosome clones through multiplexed fluorescence-labeled fingerprinting. *Genomics* **56**: 237-246
- Dominguez, I.; Barakat, A.; Steukers, M.; Barnes, S.R.; Berry, S.T. (2001). Investigation of syntenic relationships between the *Helianthus annuus*, *Arabidopsis thaliana* and *Beta vulgaris* genomes revealed using ESTs from these species. Plant & Animal Genome IX-Konferenz, San Diego, USA.
- El Mezawy, A. (2001). Fine mapping of the bolting gene from sugar beet (*Beta vulgaris* L.) with molecular markers. Dissertation, Christian-Albrechts-Universität Kiel
- Emerson, R.A.; Beadle, G.W.; Fraser, A.C. (1935). A summary of linkage studies in maize. Cornell Univ Agr Exp Sta Memoir **180**
- Eyers, M.; Edwards, K. Schuch, W. (1992). Construction and characterisation of a yeast artificial chromosome library containing two haploid *Beta vulgaris* L. genome equivalents. *Gene* **121**: 195-201
- Feinberg, A.P.; Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* **132**: 6-13
- Flavell, R.B.; Bennett, M.D.; Smith, J.B.; Smith, D.B. (1974). Genome size and proportion of repeated nucleotide sequence DNA in plants. *Biochem. Genet.* **12**: 257-268
- Franke, W. (1997). Nutzpflanzenkunde. Georg Thieme Verlag, Stuttgart und New York
- Franz, P.F.; Alonso-Blanco, C.; Liharska, T.B.; Peeters, A.J.; Zabel, P.; de Jong, J.H. (1996). High-resolution physical mapping in *Arabidopsis thaliana* and tomato by fluorescence in situ hybridization to extended DNA fibres. *Plant J* **9**: 421-430
- Frijters, A.C.J.; Zhang, Z.; van Damme, M.; Wang, G.L.; Ronald, P.C.; Michelmore, R.W. (1997). Construction of a bacterial artificial chromosome library containing large *EcoRI* and *HindIII* genomic fragments of lettuce. *Theor Appl Genet* **94**: 390-399
- Giovannoni, J.J.; Noensie, E.N.; Ruezinsky, D.M.; Lu, X.; Tracy, S.L.; Ganai, M.W.; Martin, G.B.; Pillen, K.; Alpert, K.; Tanksley, S.D. (1995). Molecular genetic analysis of ripening inhibitor loci of tomato: a first step in genetic map-based cloning of fruit ripening genes. *Mol Gen Genet* **248**: 195-206
- Giraudat, J.; Hauge, B.M.; Valon, C.; Smalle, J.; Parcy, F.; Goodman, H.M. (1992). Isolation of the Arabidopsis ABI3 gene by positional cloning. *Plant Cell* **4**: 1251-1261
- Gisselsson, D.; Mandahl, N.; Palsson, E.; Gorunova, L.; Hoglund, M. (2000). Locus-specific multifluor FISH analysis allows physical characterization of complex chromosome abnormalities in neoplasia. *Genes Chromosomes Cancer* **28**: 347-352
-

-
- Gorman, S.W.; Banasiak, D.; Fairley, C.; McCormick, S. (1996). A 610 kb YAC clone harbours 7 cM of tomato (*Lycopersicon esculentum*) DNA that includes the male sterile 14 gene and a hotspot for recombination. *Mol Gen Genet* **251**: 52-59
- Green, E.D.; Olson, M.V. (1990). Chromosomal region of the cystic fibrosis gene in yeast artificial chromosomes: A model for human genome mapping. *Science* **250**: 94-98
- Green, E.D.; Riethman, H.C.; Dutchik, J.E.; Olson, M.V. (1991). Detection and characterization of chimeric yeast artificial-chromosome clones. *Genomics* **11**: 658-669
- Hallden, C.; Hjerdin, A.; Rading, I.M.; Säll, T.; Fridlundh, B.; Johannisdottir, G.; Tuveesson, S.; Akesson, C.; Nilsson, N.O. (1996). A high density RFLP linkage map of sugar beet. *Genome* **39**: 634-645
- Hamilton, C.M. (1997). A binary-BAC system for plant transformation with high-molecular-weight DNA. *Gene* **200**: 107-116
- Hamilton, C.M.; Frary, A.; Lewis, C.; Tanksley, S.D. (1996). Stable transfer of intact high molecular weight DNA into plant chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 9975-9979
- Hamilton, C.M.; Frary, A.; Xu, Y.; Tanksley, S.D.; Zhang, H.B. (1999). Construction of tomato genomic DNA libraries in a binary-BAC (BIBAC) vector. *Plant J.* **18**: 223-229
- Hansen, M.; Kraft, T.; Christiansson, M.; Nilsson, N.O. (1999). Evaluation of AFLP in *Beta*. *Theor Appl Genet* **98**: 845-852
- Hejna, J.A.; Johnstone, P.L.; Kohler, S.L.; Bruun, D.A.; Reifsteck, C.A.; Olson, S.B.; Moses, R.E. (1998). Functional complementation by electroporation of human BACs into mammalian fibroblast cells. *Nucleic Acids Res* **26**: 1124-1125
- Hiesel, R.; Schobel, W.; Schuster, W.; Brennicke, A. (1987). The cytochrome oxidase subunit I and subunit III genes in *Oenothera* mitochondria are transcribed from identical promotor sequences. *EMBO J.* **6**: 29-34
- Holmes, D.S.; Quigley, M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem* **114**: 193-197
- Hosoda, F.; Nishimura, S.; Uchida, H.; Ohki, M. (1990). An F factor based cloning system for large DNA fragments. *Nucleic Acids Res* **18**: 3863-3869
- Jackson, S.A.; Dong, F.; Jiang, J. (1999). Digital mapping of bacterial artificial chromosomes by fluorescence *in situ* hybridization. *Plant J* **17**: 581-587
- Johanson, U.; West, J.; Lister, C.; Michaels, S.; Amasino, R.; Dean, C. (2000). Molecular analysis of FRIGIDA, a major determinant of natural variation in Arabidopsis flowering time. *Science* **290**: 344-347
- Keller, W. (1936). Inheritance of some major color types in beets. *J Agric Res* **52**: 27-38
-

-
- Killian, A.; Chen, J.; Han, F.; Steffenson, B.; Kleinhofs, A. (1997). Towards map-based cloning of the barley stem rust resistance genes *Rpg1* and *rpg4* using rice as an intergenomic cloning vehicle. *Plant Mol Biol* **35**: 187-195
- Kim, U.J. (1999). How to build a BAC library. California Institute of Technology: http://informa.bio.caltech.edu/idx_www_tree.html
- Kim, U.J.; Birren, B.W.; Slepak, T.; Mancino, V.; Boysen, C.; Kang, H.L.; Simon, M.I.; Shizuya, H. (1996). Construction and characterization of a human bacterial artificial chromosome library. *Genomics* **34**: 213-218
- Kim, U.J.; Shizuya, H.; de Jong, P.J.; Birren, B.; Simon, M.I. (1992). Stable propagation of cosmid sized human DNA inserts in F factor based vector. *Nucleic Acids Res* **20**: 1083-1085
- Klein, P.E.; Klein, R.R.; Cartinhour, S.W.; Ulanich, P.E.; Dong, J.; Obert, J.A.; Morishige, D.T.; Schlueter, S.D.; Childs, K.L.; Ale, M.; Mullet, J.E. (2000). A high-throughput AFLP-based method for constructing integrated genetic and physical maps: progress toward a sorghum genome map. *Genome Res* **10**: 789-807
- Kleine, M. (1993). Die Klonierung von DNA aus Zuckerrüben (*Beta vulgaris* L.) und Gerste (*Hordeum vulgare* L.) in künstliche Hefechromosomen (YACs) und die Isolation und Charakterisierung von definierten Klonen. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München
- Kleine, M. Dargatz, H.; Jung, C. (1998). Size increase of YAC insertions without fractionation by PFGE. Elsevier Trends Journals Technical Tips Online: <http://tto.trends.com>
- Kleine, M.; Cai, D.; Elbl, C.; Herrmann, R.G.; Jung, C. (1995). Physical mapping and cloning of a translocation in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) carrying a gene for nematode (*Heterodera schachtii* L.) resistance from *B. procumbens*. *Theor Appl Genet* **90**: 399-406
- Kleine, M.; Michalek, W.; Diefenthal, T.; Dargatz, H.; Jung, C. (1997). Construction of a *MluI*-YAC library from barley (*Hordeum vulgare* L.) and analysis of YAC insert terminal regions. *Genome* **40**: 896-902
- Kleine, M.; Michalek, W.; Graner, A.; Hermann, R.G.; Jung, C. (1993). Construction of a barley (*Hordeum vulgare* L.) YAC library and isolation of a *Hor1*-specific clone. *Mol Gen Genet* **240**: 265-272
- Klein-Lankhorst, R.M.; Salentijn, E.M.J.; Dirkse, W.G.; Arens-de Reuver, M.; Stiekema, W.J. (1994). Construction of a YAC library from a *Beta vulgaris* fragment addition and isolation of a major satellite DNA cluster linked to the beet cyst nematode resistance locus *Hs1^{pat-1}*. *Theor Appl Genet* **89**: 426-434
- Kolchinsky, A.; Funke, R. (1995). Pulsed Field Gel Electrophoresis. In: Molecular Biology. Current Innovations and Future Trends, Part 1 (Griffin AM & Griffin HG, Eds.): 69-82, Horizon Scientific Press, Wymondham, U.K.
-

-
- Koorneef, M.; Alonso-Blanco, C.; Blankestijn-de Vries, H.; Hanhart, C.J.; Peeters, A.J.M. (1998). Genetic interaction among late-flowering mutants in *Arabidopsis*. *Genetics* **148**: 1-9
- Koorneef, M.; Hanhart, C.J.; van der Veen, J.H. (1991). A genetic and physiological analysis of late flowering mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet* **229**: 57-66
- Kouprina, N.; Campbell, M.; Graves, J.; Campbell, E.; Meincke, L.; Tesmer, J.; Grady, D.L.; Doggett, N.A.; Moyzis, R.K.; Deaven, L.L.; Larionov, V. (1998). Construction of human chromosome 16- and 5-Specific Circular YAC/BAC Libraries by *in Vivo* Recombination in Yeast (TAR Cloning). *Genomics* **53**: 21-28
- Krupinska, K. (1992). Transcriptional control of plastid gene expression during development of primary foliage leaves of barley grown under a daily light-dark regime. *Planta* **186**: 294-303
- Kurata, N.; Umehara, Y.; Tanoue, H.; Sasaki, T. (1997). Physical mapping of the rice genome with YAC clones. *Plant Mol Biol* **35**: 101-113
- Larin, Z.; Monaco, A.P.; Lehrach, H. (1991). Yeast artificial chromosome libraries containing large inserts from mouse and human DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 4123-4127
- Larionov, V.; Kouprina, N.; Nikolaishvili, N.; Resnick, M.A. (1994). Recombination during transformation as a source of chimeric mammalian artificial chromosomes in yeast (YACs). *Nucleic Acids Res* **22**: 4154-4162
- Laurie, D.A. (1997). Comparative genetics of flowering time. *Plant Molecular Biology* **35**: 167-177
- Leonardo, E.D.; Sedivy, J.M. (1990). New vector for cloning large eukaryotic DNA segments in *Escherichia coli*. *Biotechnology* **8**: 841-844
- Leutweiler, L.S.; Hough-Evens, B.R.; Meyerowitz, E.M. (1984). The DNA of *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet* **194**: 15-23
- Levy, Y.Y.; Dean, C. (1998). The transition to flowering. *Plant Cell* **10**: 1973-1989
- Li, R.; Mignot, E.; Faraco, J.; Kadotani, H.; Cantanese, J.; Zhao, B.; Lin, X.; Hinton, L.; Ostrander, E.A.; Patterson, D.F.; de Jong, P.J. (1999). Construction and characterization of an eightfold redundant dog genomic bacterial artificial chromosome library. *Genomics* **58**: 9-17
- Libert, F.; Lefort, A.; Okimoto, R.; Womack, J. (1993). Construction of a bovine genome library of large yeast artificial chromosome clones. *Genomics* **18**: 270-276
- Lin, Y.R.; Zhu, L.; Ren, S.; Yang, J.; Schertz, K.F.; Paterson, A.H. (1999). A *Sorghum propinquum* BAC library, suitable for cloning genes associated with loss-of-function mutations during crop domestication. *Mol. Breeding* **5**: 511-520
-

-
- Lumsden, J.M.; Lord, E.A.; Cato, S.A.; Richardson, T.E.; van Stijn, T.C.; Broom, M.F.; Patel, K.; Montgomery, G.W. (1999). The application of AFLP fingerprinting to construct a YAC contig containing ADH2 and MTP on sheep chromosome 6. *Cytogenet Cell Genet* **84**: 225-229
- Ma, H. (1998). To be, or not to be, a flower – control of floral meristem identity. *Trends in Genetics* **14**: 26-32
- Mabberley, D.J. (1997). *The plant book*. Cambridge University Press, Cambridge, U.K.
- Macknight, R.; Bancroft, I.; Page, T.; Lister, C.; Schmidt, R.; Love, K.; Westphal, L.; Murphy, G.; Sherson, S.; Cobbett, C.; Dean, C. (1997). *FCA*, a gene controlling flowering time in Arabidopsis, encodes a protein containing RNA-binding domains. *Cell* **89**: 737-745
- Marek, L.F.; Shoemaker, R.C. (1997). BAC contig development by fingerprinting analysis in soybean. *Genome* **40** 420-427
- Martin, G.B.; Brommonschenkel, S.H.; Chunwongse, J.; Frary, A.; Ganai, M.W.; Spivey, R.; Wu, T.; Earle, E.D.; Tanksley, S.D. (1993). Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science* **262**: 1432-1436
- Martin, G.B.; Williams, J.G.K.; Tanksley, S.D. (1991). Rapid identification of markers linked to a *Pseudomonas* resistance gene in tomato by using random primers and near-isogenic lines. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 2336-2340
- McArthur, J.W. (1934). Linkage groups in tomato. *J Genet* **29**: 123-133
- Meier-Ewert, S.; Maier, E.; Ahmadi, A.; Curtis, J.; Lehrach, H. (1993). An automated approach to generating expressed sequence catalogues. *Nature* **361**: 375-376
- Mejia, J.E.; Monaco, A.P. (1997). Retrofitting vectors for *Escherichia coli*-based artificial chromosomes (PACs and BACs) with markers for transfection studies. *Genome Res* **7**: 179-186
- Melchinger, A.E. (1990). Use of molecular markers in breeding for oligogenic disease resistance. *Plant Breeding* **104**: 1-19
- Michelmore, R.W.; Paran, I.; Kesseli, R.V. (1991). Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 9828-9832
- Morgan, T.H. (1910). Sex limited inheritance in *Drosophila*. *Science* **32**: 120-122
- Mozo, T.; Dewar, K.; Dunn, P.; Ecker, J.R.; Fischer, S.; Kloska, S.; Lehrach, H.; Marra, M.; Martienssen, R.; Meier-Ewert, S.; Altmann, T. (1999). A complete BAC-based physical map of the *Arabidopsis thaliana* genome. *Nat. Genetics* **22**: 271-275
-

-
- Mozo, T.; Fischer, S.; Meier-Ewert, S.; Lehrach, H.; Altmann, T. (1998). Use of the IGF BAC library for physical mapping of the *Arabidopsis thaliana* genome. *Plant J* **16**: 377-384
- Mozo, T.; Fischer, S.; Shizuya, H.; Altmann, T. (1998). Construction and characterization of the IGF *Arabidopsis* BAC library. *Mol Gen Genet* **258**: 562-570
- Mullins, K.B.; Falona, F.A. (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. *Meth Enzymol* **155**: 335
- Munerati, O. (1931). L'eredita della tendenza alla annualita nella comune barbatietola coltivata. *Ztschr Züchtung, Reihe A, Pflanzenzüchtung* **17**: 84-89
- Nakamura, S.; Asakawa, S.; Ohmido, N.; Fukui, K.; Shimizu, N.; Kawasaki, S. (1997). Construction of an 800-kb contig in the near-centromeric region of the rice blast resistance gene *Pi-ta²* using a highly representative rice BAC library. *Mol Gen Genet* **254**: 611-620
- Nam, Y.W.; Penmetsa, R.V.; Endre, G.; Uribe, P.; Kim, D.; Cook, D.R. (1999). Construction of a bacterial artificial chromosome library of *Medicago truncatula* and identification of clones containing ethylene-response genes. *Theor Appl Genet* **98**: 638-646
- Nishimura, M.; Nakamura, S.; Hayashi, N.; Asakawa, S.; Shimizu, N.; Kaku, H.; Hasebe, A.; Kawasaki, S. (1998). Construction of a BAC library of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* and finding specific genome regions in which ist transposons tend to cluster. *Biosci Biotechnol Biochem* **62**: 1515-1521
- O'Connor, M.; Peifer, M.; Bender, W. (1989). Construction of large DNA segments in *Escherichia coli*. *Science* **244**: 1307-1312
- Orkin, S.H. (1986). Reverse genetics and human disease. *Cell* **47**: 845-850
- Osoegawa, K.; Woon, P.Y.; Zhao, B.; Frengen, E.; Tateno, M.; Catanese, J.J.; de Jong, P.J. (1998). An Improved Approach for Construction of Bacterial Artificial Chromosome Libraries. *Genomics* **52**: 1-8
- Owen, F.V. (1954). The significance of single gene reactions in sugar beet. *Proc Am Soc Sugar Beet Techn* **8**: 392-398
- Owen, F.V.; Carsner, E.; Stout, M. (1940). Photothermal induction of flowering in sugar beets. *J Agric Res* **61**: 101-124
- Owen, F.V.; McFarlane, J.S. (1958). Successive annual back crosses to a nonbolting in bred line of sugar beets. *J Amer Soc Sugar Beet Technol* **10**: 124-132
- Owen, F.W.; Ryser, G.K. (1942). Some Mendelian characters in *Beta vulgaris* L. and linkage observed in the Y-R-B group. *J Agric Res* **65**: 153-171
-

-
- Patocchi, A.; Vinatzer, B.A.; Gianfranceschi, L.; Tartarini, S. Zhang, H.B., Sansavini, S.; Gessler, C. (1999). Construction of a 550 kb BAC contig spanning the genomic region containing the apple scab resistance gene Vf. *Mol Gen Genet* **262**: 884-891
- Pillen, K.; Steinrücken, G.; Wricke, G.; Herrmann, R.G.; Jung, C. (1992). A linkage map of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Theor Appl Genet* **84**: 129-135
- Pineiro, M.; Coupland, G. (1998). The control of flowering time and floral identity in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **117**: 1-8
- Poustka, A.; Lehrach, H. (1988). Chromosome jumping: a long range cloning technique. In: Genetic engineering, Vol. 10 (Setlow JK, Ed.): 169-193, Plenum Press, New York NY, USA
- Reamon-Büttner, S.M.; Schmidt, T.; Jung, C. (1999). AFLPs represent highly repetitive sequences in *Asparagus officinalis* L. *Chromosome Research* **7**: 297-304
- Ryals, J.A.; Neuenschwander, U.H.; Willits, M.G.; Molina, A.; Steiner, H.Y.; Hunt, M.D. (1996). Systemic acquired resistance. *Plant Cell* **8**: 1809-1819
- Sadeghian, Y.W. (1993). Bolting in sugar beet, genetics and physiological aspects. The Swedish University of Agric Sci Dep of Plant Breeding Research. Svalov
- Saghai-Marouf, M.A.; Soliman, K.M.; Jorgensen, R.A.; Allard, R.W. (1984). Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 8014-8018
- Salimath, S.S.; Bhattacharyya, M.K. (1999). Generation of a soybean BAC library, and identification of DNA sequences tightly linked to the *Rps1-k* disease resistance gene. *Theor Appl Genet* **98**: 712-720
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning – A Laboratory Manual*. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY, USA
- Sanchez de la Hoz, M.P.; Davila, J.A.; Loarce, Y.; Ferrer, E. (1996). Simple sequence repeat primer used in polymerase chain reaction amplifications to study genetic diversity in barley. *Genome* **39**: 112-117
- Sanger, F.; Nickler, S.; Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5463-5467
- Sax, K. (1923). The association of size differences with seed-coat pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. *Genetics* **8**: 552-560
- Schmidt, R.; Putterill, J.; West, J.; Cnops, G.; Robson, F.; Coupland, G.; Dean, C. (1994). Analysis of clones carrying repeated DNA sequences in two YAC libraries of *Arabidopsis thaliana* DNA. *Plant J* **5**: 735-744
-

-
- Schmidt, T. (1998). Genome, Chromosomen und repetitive DNA – Modelle der Chromosomenstruktur und Sequenzevolution und ihre Anwendung in der Genomanalyse von Nutzpflanzen. Habilitationsschrift, Christian-Albrechts-Universität Kiel
- Schmidt, T.; Jung, C.; Heslop-Harrison, J.S.; Kleine, M. (1997). Detection of alien chromatin conferring resistance to the beet cyst nematode (*Heterodera schachtii* Schm.) in cultivated beet (*Beta vulgaris* L.) using *in situ* hybridization. *Chromosome Res.* **5**: 186-193
- Schondelmaier, J.; Jung, C. (1997). Chromosomal assignment of the nine linkage groups of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) using primary trisomics. *Theor Appl Genet* **95**: 590-596
- Schondelmaier, J.; Steinrücken, G.; Jung, C. (1996). Integration of AFLP markers into a linkage map of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Plant Breeding* **115**: 231-237
- Schumacher, K.; Ganal, M.; Theres, K. (1995). Genetic and physical mapping of the lateral suppressor (ls) locus in tomato. *Mol Gen Genet* **246**: 761-766
- Schumacher, K.; Schondelmaier, J.; Barzen, E.; Steinrücken, G.; Borchardt, D.; Weber, W.E.; Jung, C.; Salamini, F. (1997). Combining different linkage maps in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) to make one map. *Plant Breeding* **116**: 23-38
- Schwartz, D.C.; Cantor, C.R. (1984). Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* **37**: 67-75
- Sheng, Y.L.; Mancino, V.; Birren, B. (1995). Transformation of *Escherichia coli* with large DNA molecules by electroporation. *Nucleic Acids Res* **23**: 1990-1996
- Shimamoto, Y.; Tanada, T.; Abe, J. (1990). Analysis for bolting of sugar beet by means of the test crosses of biennial lines with annual line. *Proc Jpn Soc Sugar Beet Technol* **32**: 134-137
- Shinozaki, K.; Ohme, M.; Tanaka, M.; Wakasugi, T.; Hayashida, N.; Matsubayashi, T.; Zaita, N.; Chunwongse, J.; Obokata, J.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Ohto, C.; Torazawa, K.; Meng, B.Y.; Sugita, M.; Deno, H.; Kamogashira, T.; Yamada, K.; Kusuda, J.; Takaiwa, F.; Kato, A.; Tohdoh, N.; Shimada, H.; Sugiura, M. (1986). The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. *EMBO J.* **5**: 2043-2049
- Shizuya, H.; Birren, B.; Kim, U.J.; Mancino, V.; Slepak, T.; Tachiiri, Y.; Simon, M. (1992). Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc Nat Acad Sci USA* **89**: 8794-8797
- Siedler, H.; Graner, A. (1991). Construction of physical maps of the *Hor1* locus of two barley cultivars by pulsed field gel electrophoresis. *Mol Gen Genet* **226**: 177-181
- Simons, G.; van der Lee, T.; Diergaarde, P.; van Daelen, R.; Groenendijk, J.; Frijters, A.; Büschges, R.; Hollricher, K.; Töpsch, S.; Schulze-Lefert, P.; Salamini, F.; Zabeau, M.;
-

-
- Vos, P. (1997). AFLP-based fine mapping of the *Mlo* gene to a 30 kb DNA segment of the barley genome. *Genomics* **44**: 61-70
- Smalle, J.; Kurepa, J.; Haegman, M.; Gielen, J.; van Montagu, M.; van der Straeten, D. (1995). The trihelix DNA-binding motif in higher plants is not restricted to the transcription factors GT-1 and GT-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 3318-3322
- Smith, C.L.; Matsumoto, T.; Niwa, O.; Klco, S.; Fan, J.B.; Yanagida, M.; Cantor, C.R. (1987). An electrophoretic karyotype for *Schizosaccharomyces pombe* by pulsed-field gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* **15**: 4481-4489
- Sorokin, A.; Marthe, F.; Houben, A.; Pich, U. (1994). Polymerase chain reaction mediated localization of RFLP clones to microisolated translocation chromosomes of barley. *Genome* **37**: 550-555
- Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**: 503-517
- Strong, S.J.; Ohta, Y.; Litman, G.W.; Amemiya, C.T. (1997). Marked improvement of PAC and BAC cloning is achieved using electroelution of pulsed-field gel-separated partial digests of genomic DNA. *Nucleic Acids Res* **25**: 3959-3961
- Stubbe, H. (1965). Kurze Geschichte der Genetik bis zur Wiederentdeckung der Vererbungsregeln Gregor Mendels. Jena VEB Gustav Fischer
- Sturtevant, A.H. (1913). The linear arrangement of six sex-linked factors in *Drosophila*, as shown by their mode of association. *J Exptl Zool* **14**: 43-59
- Tanksley, S.D.; Ganai, M.W.; Martin, G.B. (1995). Chromosome landing: a paradigm for map-based gene cloning in plants with large genomes. *Trends Genet* **11**: 63-68
- Tanksley, S.D.; Rick, C.M. (1980). Isozymic gene linkage map of the tomato: applications in genetics and breeding. *Theor Appl Genet* **57**: 161-170
- Tanksley, S.D.; Young, N.D.; Paterson, A.H.; Bonierbale, M.W. (1989). RFLP-mapping in plant breeding: new tools for an old science. *Biotechnology* **7**: 257-264
- Tao, Q.; Zhang, H.B. (1998). Cloning and stable maintenance of DNA fragments over 300 kb in *Escherichia coli* with conventional plasmid-based vectors. *Nucleic Acids Res* **26**: 4901-4909
- Van der Straeten, D.; Rodrigues-Pousada, R.A.; Villarroel, R.; Hanley, S.; Goodman, H.M.; van Montagu, M. (1992). Cloning, genetic mapping, and expression analysis of an *Arabidopsis thaliana* gene that encodes 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 9969-9973
- Vanhouten, W.; MacKenzie, S. (1999). Construction and characterization of a common bean bacterial artificial chromosome library. *Plant Mol. Biol.* **40**: 977-983
-

-
- Vinatzer, B.A.; Zhang, H.B.; Sansavini, S. (1998). Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library of apple. *Theor Appl Genet* **97**: 1183-1190
- Vos, P.; Hogers, R.; Bleeker, M.; Reijans, M.; van de Lee, T.; Hornes, M.; Frijters, A.; Pot, J.; Peleman, J.; Kuiper, M.; Zabeau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* **23**: 4407-4414
- Wang, G.L.; Holsten, T.E.; Song, W.Y.; Wang, H.P.; Ronald, P.C. (1995). Construction of a rice bacterial artificial chromosome library and identification of clones linked to the *Xa-21* disease. *Plant J* **7**: 525-533
- Weller, J.L.; Reid, J.B.; Taylor, S.A.; Murfet, I.C. (1997). The genetic control of flowering in pea. *Trends Plant Sci* **2**: 412-418
- Willetts, N.; Skurry, R. (1987). Structure and function of the F-factor and mechanism of conjugation. In: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology, Vol. 2 (Neidhardt, F.C., Ed.): 1110-1137, Am Soc Microbiol, Washington DC, USA
- Williams, J.G.K.; Kubelik, A.R.; Livak, K.J.; Rafalski, J.A.; Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* **18**: 6531-6535
- Woo, S.S.; Jiang, J.; Gill, B.G.; Paterson, A.H.; Wing, R.A. (1994). Construction and characterization of a bacterial chromosome library of *Sorghum bicolor*. *Nucleic Acids Res* **22**: 4922-4931
- Woo, S.S.; Rastogi, V.K.; Zhang, H.B.; Paterson, A.H.; Schertz, K.F.; Wing, R.A. (1995). Isolation of sorghum megabase-size DNA and application for physical mapping and bacterial and yeast artificial chromosome library construction. *Plant Mol. Biol. Rep.* **13**: 82-94
- Xoconostle-Cázares, B.; Lozoya-Gloria, E.; Herrera-Estrella, L. (1993). Gene cloning and identification. In: *Plant Breeding: Principles and prospects* (Hayward, M.D.; Bosemark, N.O. & Romagosa, I., Eds.): 107-125, Chapman & Hall, London, U.K.
- Yang, D.; Parco, A.; Nandi, S.; Subudhi, P.; Zhu, Y.; Wang, G.; Huang, N. (1997a). Construction of a bacterial artificial chromosome (BAC) library and identification of overlapping BAC clones with chromosome 4-specific RFLP markers in rice. *Theor Appl Genet* **95**: 1147-1154
- Yang, X.W.; Model, P.; Heintz, N. (1997b). Homologous recombination based modification in *Escherichia coli* and germline transmission in transgenic mice of a bacterial artificial chromosome. *Nat. Biotechnol.* **15**: 859-865
- Yokobata, K.; Trenchak, B.; de Jong, P.J. (1990). Rescue of unstable cosmids by *in vitro* packaging. *Nucleic Acids Res* **19**: 403-404
-

-
- Zhang, H.B.; Martin, G.B.; Tanksley, S.D.; Wing, R.A. (1994). Map-based cloning in crop plants: tomato as a model system II. Isolation and characterization of a set of overlapping yeast artificial chromosomes encompassing the jointless locus. *Mol Gen Genet* **244**: 613-621
- Zhang, H.B.; Wing, R.A. (1997). Physical mapping of the rice genome with BACs. *Plant Mol Biol* **35**: 115-127
- Zhang, H.B. (1999). Construction of a BAC library. Texas BAC Center, Texas A & M University: <http://hbz.tamu.edu/bacindex.html>
- Zhang, H.B.; Zhao, X.; Ding, X.; Paterson, A.H.; Wing, R.A. (1995). Preparation of megabase-size DNA from plant nuclei. *Plant J.* **7**: 175-184
- Zhu, B.; Smith, J.A.; Tracey, S.M.; Konfortov, B.A.; Welzel, K.; Schalkwyk, L.C.; Lehrach, H.; Kollers, S.; Masabanda, J.; Buitkamp, J.; Fries, R.; Williams, J.L.; Miller, J.R. (1999). A 5x genome coverage bovine BAC library: production, characterization, and distribution. *Mamm. Genome* **10**: 706-709
- Zhu, H.; Dean, R.A. (1999). A novel method for increasing the transformation efficiency of *Escherichia coli*-application for bacterial artificial chromosome library. *Nucl. Acids Res* **27**: 910-911
- Zhu, T.; Shi, I.; Funke, R.P.; Gresshoff, P.M.; Keim, P. (1996). Characterization and application of soybean YACs to molecular cytogenetics. *Mol Gen Genet* **252**: 483-488
- Zimmer, R.; Verrinder Gibbins, A.M. (1997). Construction and characterization of a large-fragment chicken bacterial artificial chromosome library. *Genomics* **42**: 217-226
- Zwick, M.S.; Islam-Faridi, M.N.; Czeschin Jr., D.G.; Wing, R.A.; Hart, G.E.; Stelly, D.M.; Price, H.J. (1998). Physical mapping of the *ligueless* linkage group in *Sorghum bicolor* using rice RFLP-selected sorghum BACs. *Genetics* **148**: 1983-1992
-

8 Anhang

8.1 Klonierte YAC-Endklone einschließlich der *consensus*-Sequenzlänge.

YAC-Ende	Subklon (Klon-Bank-Nr.)	Länge Subklon [bp]	Länge <i>consensus</i> - Sequenz [bp]
Y5C6L	p5C6L (2364)	258	301
	p5C6L2 (2365)	301	
Y5C6R	p5C6R (2366)	1257	1257
Y7A8L	p7A8L (2367)	1030	1030
Y7A8R	p7A8R (2368)	202	427
	p7A8L2 (2427)	440	
Y29B6L	p29B6L (2369)	1144	1144
	p29B6L2 (2370)	510	
Y29B6R	p29B6R (2363)	923	923
Y67G1L	p67G1L2 (2372)	158	1731
	p67G1LoH (2373)	1731	
Y67G1R	p67G1R (2374)	647	647
Y73G8L	p73G8L (2375)	1462	1462
Y73G8R	p73G8R (2376)	1206	1206
Y81D10L	p81D10L (2377)	202	1019
	p81D10L2 (2378)	940	
Y81D10R	p81D10R (2379)	211	1705
	p81D10R2 (2380)	1574	
Y89F10L	p89F10L (2381)	510	510
Y89F10R	p89F10R (2382)	532	532

Y99F8L	p99F8L (2383)	503	503
Y99F8R	p99F8R (2384)	522	522
Y102H12L	p102H12L (2385)	151	1141
	p102H12L2 (2362)	1130	
Y102H12R	p102H12R (2387)	299	833
	p102H12R2 (2388)	433	
	p102H12R3 (2389)	246	
Y49F7L	p49F7L (2390)	375	375
Y49F7R	p49F7R (2391)	1879	1879
Y85A6L	p85A6L (2392)	682	682
Y85A6R	p85A6R (2393)	281	357
	p85A6R2 (2394)	378	
Y101A7L	p101A7L (2395)	396	802
	p101A7L2 (2396)	802	
Y101A7R	p101A7R (2397)	175	435
	p101A7R2 (2398)	410	

8.2 consensus-Sequenzen der YAC-Enden.

Darstellung in 5'→3'-Richtung; die zur YAC-Klonierung verwendete *EcoRI*-Schnittstelle ist fett dargestellt.

Y5C6L (301 bp)

```
TCGACACTCG GACATGGGTA TAGCTCTTAG ACACTTCATT TTGGGCCAAA ATCATTGAAA
ACTTTCACAA AATAGCCAAG TTGGACACTT GGACGCATAC CCATGTTAGA CATGGGTACC
CGAGTCCAAG TAACATAGCT CTTCATAACAT TTTATTACTA ATGGCAATTC ATCTCCTAAC
CACATGCACT TAAATTGTAC ATACTGTAGA ATTTAGATAT GATCATGCCC ACTAATTCTA
CCCTAACAAAC CATTATAAGA GAAGACCAGA ACGAGCATT C ATGAAGTAAT ACTAAGAATT
```

c

Y5C6R (1257 bp)

```
GAATTCCAAT TTTCTAAAAT ATTGGTACAT ATTGATATGA TTTCCAGAGC TGTATGTGAA
AGGCTGTTCT TGCGTTTGAA GCTGCTAGGC GCTA?TAGTT CTCTTCTTCC ATTGCTGTTG
GTCATATTAA GATATTGCAA TTCTTTTATG TAGTTTGCAT CCCACCAAGA CTTGTTTGTG
TTTGCTTTTCG TTACGTATGC CATGTGCATA ACCTCAGTTA TAAACTGTCT CTAGAGTTCT
CCTACTGTAT TTCAAAGTTA GCATTGATGC TTTTGATTAG CCCTTAACT TTGAAATCTT
TGAGCACACA CACATTTAAG GTAGTTCTAA TTTTGTCTCA TAAGTCAATC CATGATCAAC
AAAGAAGTTA ATCAGATCCC AGTTACCATA AACAAATTAC AAGTGGAAAA GCAATTACAT
CCGTGATGTA GTTTTCTGTG GGAATTGCTG CTTATAAGCT TTCTTGGCTT TGCTTAATTA
CCAATAAAGA AGTACCTCGG CTTGCTGCTG GTATGAAAGC AAGATTCACT TCAGTGGCTT
CTAGTTCATT ACTTCAATGG TGAAGTACA TAGCTGGAAC TTTCTTTGAG CCTCATGTGG
TTTTTTTACC CTTTCTTCTT TCTTTGCTCA CATTGATAAA TGAATTGAGA ACACTCATAT
TCTGTGATGT GTGGCATATG ACTTTTCACT TCTCCACATG AAcAAAACAC TCACTCTGTC
CATGTGGTAC AATTGAATCT TCACTTCCCC ACACGAGAAA AGGAGAAAGA CACATGTTTA
AACCTCCTTT TAGATACTAG TTTCTGCATT TATATAACAC TCCGTACATA AATTTAATTT
GTTATAGAAT GATGCAGAGA AAATGTATGG GACAGTTGCC CAGATAAAAT CTGAAGAACA
TACTAGTCAA AGATCAATTT ATAATGGTTT CTTTGGGCTA TTTGGCAATA GACATCGTCA
TATGCGTACG CTAGAGAAAA GATTGGAGGA TATGGAGGAT AGTATGAGGT TGGAAACAATC
TTCATTACCT GAAAAGGTTT GTGCTTATTT TCTGCATGCA TTTAGTGAAG ATGTTACAGA
TGAAATTGAT CTAATGTTGC TTGTACAAGG AGTGGTCTAG GAATGGTAAC GGGTAGGTCC
TAAACCCATA GTCCCACTACT AGGGTCTGAA AAAAGAACCT GATTGGTACC TGTAGGGTCT
TACAAGTCCA GGATTCAAAT GGGTCCTAAA CTTGGTATTC TCAATATTTT TGTGGCC
```

Y7A8L (1030 bp)

TCGATTATAA AAAATAATTT CAGTTTAAAA ATGATGCTAT yrCAGTCATG CTAGGTTGCT
 TTTGTTTTCT TAGCTTGTTT GACTCAGTG TTGATTACAT GCTTTGTTTG TCAATCATAG
 TCCAAGCCTT AAAAAATTTG CGATGGCCCC TCTTTCGGCG AGCAATTACT CGTATGATCA
 mTTGwTTATT TGACTATTAG ATTGrAGGAT TAACATGTAG CATTACTGGG GATGTCCTTAG
 TGCGGTACAT TTTTGTTGCT TTAATTTCTT TATTTTGATT TGAGTTTGAC TTTTAGAGTT
 GACTTTAGGT TCACTTTGAT TTTAAGTTTT AAATGGTTTT AATTTATACA GAGTTATGTC
 TAGATTTTTA ATAATGGTTT TTTTTAATAA TTGTTTTAAG TACTTTAGTA TCTGATTTTC
 GTGGCAATAT TCTAAATATG CCTAAAAAAT TTCATACGTG GCAATAACAA ATTAATAATT
 CTCTATTCTT TAAATATGAA AAGTATATAT GTyGTAAGGs AAATAATTAT TGAGATGTTG
 TAACTyCTTA TTAGTTATTG CTCTTGCGCG bTTTCAAGGT CCAAGTCTAT AAGTTTAATC
 ATATTTATAC AATAATGTAT ATTTACTTGT TyCCATGCGG GATCTTAATC TTTATAGCTG
 TATACATATT TTCACAATCA ATAAACATGT GTGCATTAAC AACTAACATG TGTGCATTGA
 AGAACGGGAA AACTGTAACA AACAGAAAAA CTAATGAAGA TATAATTCTA TTTCTGAAA
 TACAACACT TTTACAAGAG TATAAAGGAC ATGACTCAAC AATAATTTAC AGTGTATGGT
 ATAGAACTAA TAAGAGACCT TGTATTATCT TTAAGATACT TCATACCATA GAAGCTTTAT
 TTGCTCAAGT TGTAGATGAA GAAGACGACT CAACCGAAAC TTCTAGATCA ACTTCCCTAT
 TACGATGGAA ATTGCAGTGG CAGCCGCAGG CGGCACAAAG AAGGTAGTGC TCTTCACTAG
 GCAT**GAATTC**

Y7A8R (1427 bp)

GAATTCTAAT GGCTTCTATT CTAGCAACAG GAGCAAAGGT CTTATCAAAA TCAATACCTT
 CTTGTTGATT ATACCCTTTA GCTACAAGTT TGGCTTTATT CCTTGTTACT GTTCCATGCT
 CATCTAGCTT GTTCTGTAA CGCCCCGACC CCTAATTATT GTAGATTAGT TTTGATTGAA
 ATAAAAATC AGCTTGTTGG CCCAATAAGT TGAGTGAGTA ACATGGCCCA TGTTTAGGCT
 TAACTCATT AAACAAACA AGAGAAAAA TAGAACAAAG TTTAGAGAGG TATTTTCATA
 CCTCTGCTCA ATTGAGCAGG CACGAAAAA GGCAGAGGA GGGAGATTGG CTGGTTGTGG
 GGTTCAAATT CCGATAACAG AAGGCGGCAC GGGGTGGTT AGGGCCGCGC TGGGCGTGGC
 TCATCGA

Y29B6L (1144 bp)

GGCCACCGTC CGGCTGTCTA GATGAATTAA CACCTTTTGT GGTGTCTGAT GAGCGTGTAT
 TCCGGCACCT TAACTCTACG TTCGGTTCAT CCCGCATCGC CAGTTCTGCT TACCAAAAAAT
 GGCCAGATTA TCTTTTTTCGT GATCACAAAA AGCAACTTAG ATAAAGATAA AGTAATATAA
 TAATCTTTAG TTTTAGATTG GAATTTGGTT CTTTTACTACT GGACCTTAGC AAGTACTCTA
 ATCAAATTCT TTTACTAGTA TTATATTTAA ATTTTTTTTT AAAGGTAAGA AGAAAGTTTT

TAGGTAGTCC GGGAGTACCT AAAATATCAT TTATAAGGAT GTGATTAAGC GAGGAATGTA
 AAAAATCTAT AATGGGAGTA ATCACCAATA ATTAAGTGAC CAACATTGAC GATCCAATTA
 GCAGCTTTAT TTGCTTCTCT GTAGATATGA CGCAGCTTCT CGCTGTCAAA GAGGAGTAGC
 ATAAGTTTGA TGTCTTGAAT AATGTTTGAA ATCTGCCAAG TTGGATTCCA AATGCCTTGA
 ACAGTGTTAG TTGATGATTA GTAGATGACA ATCTCTATAT TCTTGTATCT AGATTGTAGA
 ACTAGTTGAA GTCCCCTTTT GGAAGGCAAT AAGCCTCGAC CACCATGATT TGCATATCGC
 CGAGGTGGTA AGCTTTGAGT ACTATATTTA AATAACTAAT GGCTCCACTA CATGGAAATA
 AAGTACACCG CCTCTCGTAT AATCGGTCAC AAAATTTGTT ATAATCATCT CTTGTAACCT
 TAAATAGAAT AATTTCAAGA GAAATAATTA AATATATAAA TTGAAATAAG TTTTCAATTG
 TCAAAAAACA TTTCCGTAAT TATTTATTAC TCTTATTCAA GAACATCATT TAGTTTAATT
 TAATTTGATT ATGTTATAGG GAGTATTTTG TTTTACAAAT GGTACTACTT ATAGAGCGTG
 TTTTGTTTTAA ATTAATGCAG TTCACATAAG TTCAATGAAT TTGGGTGAAA AAAAAATAAT
 TAAATAGACC CTTGGTTTAA GGTTTACTGA TTGTTAATTT ATCTAAGCTT TTGTAAAAAA
 ACAAGAATTC AGGTCAATGA TATATAGCTT TCCCTATACT ACTATTATCT AGTGATAG**GA**

ATTC

Y29B6R (923 bp)

GGCCATATTA CTCTTGGTCT AATAGCAGTA TTGGTAGTGA CAGAGTACTG RGCAGAATTG
 ATAAAGCTTA TGTGAACCTA GTCTGGCTAG GAATGTATAC CGAGGTAAGT GTGCAATACT
 TACCTCCTGG AATCTCAGAC CATTCTCCTC TTTTATTTAC CTTGATGACA GGGAGGTCAC
 AAGGAGGGAA GCCTcTTAAA TTCATGAATG TAATGgCTAA GCAAGATGAG TTTATAGAGA
 CTGTGGAGAA AGCTTGGAGT TCTATAAATG GAAGATACAA GCTTCAGGCA GTATGGTTGA
 AGCTAAAAGC TGTCAAGAGA GAGTAGAAGc AAATgAAgAC tCagAAgATA GGGCTGgCTC
 ATGAGAAAGT GAAGGATTTA AGGCACCAgC TtCAGGATAT GCAGAGTCAG GGTGGGTTTG
 ATCAGAATGC TATAGTGCAG GCAGAAGCAA AAGATCTAAT GAATGATTTG AGACATTGGT
 CTCACATTGA GGAGAGTATT CTTCAGCAAA AATCCAGAAT TAACTGGATT CAGCAGGGAG
 ATACAAACTC TAAGCTGTTC TTTACTGCTG TTaAAGCTAG RAATGCACTC AATAGaATTG
 aTATgtTaAC TACTgATGaT gGRRGaTTAA TtAAGGRAGC TGATGAAGTA AAGAGGGAAA
 TTATGGATTT CTATAAGAWT TTGCTRGGGA CAAGAGCGTC TaCCTTGATG GGGGTGGaTC
 TGAGTACTGT TAGGGGGGGT AAATGCTTAT CTACCCATGC AAAAGATTCC TTTACTGAGAG
 AGGTTACTAT TACTAAAATT GATGAGGCTT TGGCTGGTAT TGGGAATGAT AAGGCCTAG
 GATTGGATGG GTTTAATGCC TATTTCTTCA AGAAAAGCTG GGAAAGCATT AAACATGATA
 TGTATGCaGG AATCCa**GAA TTC**

Y67G1L (1731 bp)

GAATTCATAT AACCAATTTT AACAAATCAA AAACATCATT TGTTTTGATT CTTCAAATAT
 AATTCATGAA ATTCATCATA GTTAATAATA GTTTCCTTCC GCCATAACTC ACCACACTTT

GATTAAGGGT TATTTTGTTT TTGATAACTT TTGCTCGATT TTGCTTTTAC AATATTAATT
 ACTTGCAATA GCAAATTCTT TATCAAAGCC CTTTAATACT CTAGGATTGT TTATTGTACT
 ATTATAAAAA AAATATAGAA CCAAAGAATA AAAAAATTGT ATTCAAATCT CATGGATCAA
 ATGTAAGAAGA CCAAATACAA ATTTTTATTT ATATCACAAT GTAATTTACA AATTACAAC
 AAACAACAAA CATAAAAAACA AAAAACCTAT TCCACTTCAA TTTACAATAT ATAAAGATCC
 CTAAAATTCA TATCTGCCTC CACTTTGCAC CCTACAATAC AAAAAACAGT TAGCATAGAT
 AACATACGGT AAAAAAAGG GTGAAAAATC TTATGTAATC ACTTACCAA ACATAACCTT
 ACCAAATGTT ATGGGTTGAA AAAGATAAAA AGTTTAAATT TGGGCTCTCA GAGTATTCTC
 ATCATCGAGT ACACGGGGCC CCCACATATT TTCTCCAATT GTCCACTAAA ATTATTTGAA
 TCCCTCCAAA TACTATGAGC ATCACCACAC TAAAGTAATC CAAAATGAAA CAACGTGTAC
 TCTAGTGAGA GTTCCCGCAC ATAGCAACTC GGGTTCCAAT CATTTTAATC AACAAAATAG
 GAAAAGTTTT GAGACTCTAT TTCGGAAATG GACAATTACC AAGCTCAATA GCAACACACG
 CAACTTAACA TGCGTCAAAA AAGTAGTACT TTTAAGTTTT GCTCTCGGAA AATTTTCGTC
 ATCGAACACT CTAGCCTCAT GTCCAAAAA GGGTAAATAT CAAGTTCAAC AGAATCGCAA
 CCAGCTACGT ACTCAAGCTC AACAGAATCC AACCAGCAAC CGTATCAAGC TCAACAGAAT
 CCAACCAACC AACCCCAAAG ATTGGACAAA AAAAAATAGA ACCATACCTA AGAATTGTAT
 TCCTAGATAT GTAATTTCAA CTTTAGTTTC TCATTTTCCA AAACACAATA CCTAAGAATT
 GTATTCCTAG ATATGTAATT TCAACTTTAG TTTCTCATT TTTCAAAGCAC AATACCTAAG
 AATTGTATTT CTAGATACGT GTCTTACTTT AGGATTAAGA TAAGAATGAA GTTTTCGCAA
 TTTTTCATGT TCAACAATCC GTAAAGGrTA TGCATGACAT AAAACAGTTT TAGCAAACAG
 TTGACAATAG ACTTTTTTGAT CAAAAGrGGr mCCAAATTTT TGGrTTTTCA GACAGAAATG
 ACTTATATGC AGrACAAGAC TTAATGTGGG rAGkTGCATT AGAGGTACCA AAACAAGGGT
 CTGCCTTATA CTTAGCTTTT TCACAATACC TACATGTTGC AAATGTTTCC ATCTTACCTT
 CCATTTTCATC CTTACCATT ACCTATGAGA ACACATAATG ATCCCAAATT TCAGGAGGTC
 CAGCTAGCTT GGTCTTCTTT GAAGGCACAG TTAGTGCATT CGAACCCAGTA GTGTCCGGAT
 TAGAAGCTTG AGAAAAAAA TCAATTAGTA TATAATTAAG TTAATTAATA CAATTCAGAA
 GTAGAAAGGA GATGGAGAAT TACATGTATA GGAGGTAGGA GTTGAAAGGC C

Y67G1R (647 bp)

GAATTCCTAC ACATCCTTGT GAAATCAGAC CATTTCATAGT TCTTGATCTA GATTATATAT
 TTTCTTTTTTA CTTTTTGTCT ATGGTAATTT AGCTTTTTTAG aAAATATCAA TGaTAAtTCT
 GTACTtCACA AATTtCTTGa aCGTGaTATt AATCATATTT tCTAGTTAAA AGtCCAGTTA
 AAATCAACCa ATATTaACCa tGgTTAAAAG RaGgRAAtCT TTTTCTaACA atCTaATATC
 AATaAAACTT tCCACCatCG CTTaCCTTGG TTTATTAATA TAAGTTAGAT TTTAAACTTA
 AAAAAATGATC ATTAATGTCA CGcTTAAGaA ATTTAAGaaA TATAAGaCCC aCTGaTAATa
 ATATGTGAAA AATTTGCTAC CaTTtaAAAa ACtAAAAACA AAGaaTTAtC ATTGAAAATT
 tCCCGAAAAt AAAATTACtt tTtATATATA aCAAATTATA ACCCTTGTAT AATACGGRC
 aCAaAtCTAG TTaTTatCAG AaAGCtGGTT GGaGGGtCGa AAAACATGAA CAATGTGGtT

aCaACTtaaA AACaTTGaTG ATAAATAAAG CAAAATTGTT GCTAGTaGGt CATAGtTTTT
CACTCATCAT AGGGGAGAAA AATTAGTTtC CAATTaCGTA TTTGGCC

Y73G8L (1462 bp)

GAATTCCCCA TCCTATTAGT AATTCAAAGG GAGAAAACCTT ATATACATTA CCCAACATGA
AAGCTAGCCC ACATCTTCyC CCTTCTTTGT TTGTGCGTGT TGTTTTTTGT GTTGCAACTC
ATTTCCCTTT AATAGGCTAA TTTTGACAAG GAAATCACGT AGAGGAGAAA AGAACATCCT
AATGCAGATT AGCGTATGTG GTTCTAGAAG GGTGTGATTC TTAACAACAA TATAGCTTAA
CGTCAAGTTC AAGATCCATT GCACAATGAT CGTTTATTAA TAGAATATCG GACTTCTAAT
TCCATGGTTT GAATACTTTG AGTACTTTGT GTGTGATTGG ATTTCTTAGT TAGATTCAAC
CCAAATCTTA TCTACTTAGT GATATTGATA AATGGTGCTT CTTAGTCTTT GTAGGAACCG
TAGTGAGCCT CGAACTTCTG GAATTTCTTA GTAATTGTTA ACAGAGTGTT CCTTGATTAT
AATCTAGTCT TGGTTGTTTC TCTTAGAAAA CATAAACTTC GCATCCTTGT TTTAAGATT
GTGTTTCTTT TTTGGGGTTG GAAAAGTTCG ATCAAAGGGT CAAATTTAAG ATTGTAGGkC
CyCACCATGT TAGTATCACT TyAAGCTAAG rvAGTAGAAG AAAAGACTCA ATTTGATGAT
AAATTCACAC AAGTGATAGG TCTGAATTAT GCACATGTAA TGTGTCACAG AATTGATTAC
TGCTACTGTC AAGTTGCTAG ACTATGGGTG TTTGTTTGGC AACAGGGTGG GAAGGATAAG
GAGGAATGGG ACAAGTATTC TGATGATGCC CGTCTCACTT CTTGTGGGTG GGTATCmCyT
CTAyCCyCAT mCyCsCTCCA wTAAMCCCC TGGTATGmAA ATACTAGCCT ATATGGAAAsG
GGTGTTAAAs GGTATTCACT TGwAAAATGT GCTGCCTGCG ACTCTTATGC TTTTGAATGA
AGrACATAAT AAGTCTGGAT TCGCTTGTAT AACAGTTTGG ATATCCTGTT TCAAGGACCy
tACTGATGAG rTTGATTTAC TGCThcmhmw wwCmAmwChC CTATTTGmAC ATATGCTTGT
TTGTTGATGG TTTGCATCAC TATTGCAGGG AACCATGGTG ACAAATGAGA TATTTGATGC
TTTGCGACAT GCACAAGTTT CACTGGAATC ACATGACGTC AAAATTTCCG CAGCAAATAT
TTTGAATCCG GGAGTTCTCCTC CTTCTTCTAT GATGTCATTT CTGAATAAGG TTCGAATAAT
GTCCCACATG yTTTTTTAAT TTTTTTGT TTCTACTTTT ATTTTAAAT TGAGGTGTGA
CCCAGCTGCT CAAGTGATTC ATATTTGGTT AGTGGCACTT ATTCACTCTT TCAGCCTTTT
CTATACAGTA TAGAGATCTA GCTTGTAGCA CTGTCATGCT AGAAATTTAG AGTwTAACAT
AGCTCAATTG GCTATTGTGG CC

Y73G8R (1206 bp)

GGCCAAGGAG AGAGAGAGAG AAAAAGAAAG TCGGCTGAGG AGAGGGAGAA GAAGAGGGTT
TAGGGTTTTTC TGAAATTCCC TTCCTTTTCT TTTTATACTC CCTTCAAAAAG ATAGTCACCC
TAGGTCAAGT GAAGATTAGG TTATTCTTTT AAAACTCCGA AAATTCCTAA CAAATTCATA
CTAACAATAA TTTATTCTTA TTAATYTGTA AATAGATTAA AATACCTTTT TATTAACCTC
TTTATATTTT CTTAATTAGT ACGAAATTAG TATTAAAATA CGGAGTATTA CAGGCYTCCC
CCCTTAAAAG AAGTTTCGTC CCGAAACTTT GAGGTAGCCC GTCTTAACGA CGATCTTTTG
TACTTCTAAG TCCCAAATTT CACAAGCGTT TTCTAACGTT CACACAATAG ATAAGCAGTT

TTCACACATA ACTAGCATAT AACTAACATA ATCAACATAA TTAACATACT TTAGGGTGAA
 AGCGCGAAAT TCTATCGCAT TCTTCCCCC TTAAAAGAAA AGTTACGTCC CCSTAACTCA
 CGTACCTCTT GGaAAAGCTC AGGGTACTTM AGACGSATTG CATCTTCGGS YTYCCCATGT
 GSSTYYCKSG GKAGTTTKRT TTYTYCMCAA CAMCTTGAMA ATTYTGACGK BCTTATTYCT
 CGTACTTCGC ACTTTGCGGT CTAGGATCTG GACAGGTTTC TCTTCATAGG ACAAAGTTTC
 GTCTATCTCT ACGTTTTTCAG GTTCAAGGAC ATAAGACGCA TVAGGTACAT ATCTCCGGAG
 TTGGGATACG TGAAACACGT TATGGACCCT TTCTAGGTCG TTGGGTAAAK CCAGGCGATA
 AGCAACTTTC CCTACCCTCG CCAGTATCTC ATAGGGYCCT ATGAACTTAG GGCTTAGTTT
 CCCCTTTTTT CCGAATCGCA TCACTCCTTT CATTGGGGAC ACCTTAAGCA ACACTTTTTTC
 CCCAACTTCG AAATTTTCAT CTCTTCGCTT CTGGTCTGCA TAGGATTTTT GCCTGTCTTG
 TGCAGTCTTA ATCTTTTCTT GAATGACTCG CACTTGATCC ATCGTCTCTT GAATCATATC
 AGGTCCTAAC ACTACAGTCT CACTGATGTC GTTCCAACAC AAAGGGCTAC GACTCTTCT
 CCCGTACAAC GCTTGAAATG GTGCCATCTT AATACTAGCA TGGTAGCTGT TGTGTATGA
GAATTC

Y81D10L (1019 bp)

GAATTCTCAA ACTCTTTTCT TTTCTTTTCT TTTTATTTCGC TAACGCCTGG TGTTCATCA
 CAGTCAAAAT GACTAATATT ATTTAATCAA TAATGTAGAT GTAAATTGTA ATTTTGCTTC
 ATTTTAAATA TTATAGTAGT TTTTACAAGG GCTTGATCAT TATCGTTTTT TGTCTAGCAG
 TGATATATTA TGACTTATCG AGGGAAGAGA ACGAGGGACG TACATGCAGA TGACCAGCCC
 AGTTCATTGT CTTACAGTC ACCAGGTGCT GCTGCTGCAC ACAACTCTCC TTCGACCGAA
 AATGCATCAC AATCAAACAA AAAACAAATC CTTCAATCGC AGCCATATGA GGTTCCTTCT
 AACGTTGAAT TTGGACCATT TTGCCACCA AGTGCCACCA CAACAAATCC TTCAATCACA
 CCAAGTGCAA CAACTAGCAA ACCATTAGCT ATATGGnAAA ACCCTCCTTG TATCACATCA
 AAACCGCTCA AAATCCCTCC TGTTTCTTCT ACTCATACCC CACCACTCAA GCCTTCTACT
 ATCACATCCA AACCGCTCAA AATCCCTCCT CCTTCTTCTA CTCATACCCC ACCACTCAAG
 CCTTCTACTA TCACATCCAA ACCGCTCAAA ATCCCTCATC CTTCTTCTGG TCATATCCCA
 CCACTCAACC CTTCTACTAA TAAATCAAAA CCGCTCAAAA TCCCTCATCC TTCTTCTGGT
 CATATCCCAC CACTCAACCC TTCTACCAAT ACATCAAAAT CGCTCAAAAT CCCACATCCT
 TCTTCTGGTC ATATTCGAGC ATCTCTCAAC CCATCTACTA GTACCCCGCT CAAAATCCCT
 TCTAATTCTT TTGATCCTAT CCCACCTAGT AGGTGCCTT CTAGTCATAA CTCCCCTACT
 ATCTCACCTC TTAACCCATC AGAATCCCGT AAGCCAACAA AGCAAAAAGA GGGTGAAGAA
 TCATTAATGA AGTCGAGAAC ATCAAAATCT GTACGGTCAA CATCATATCC AGATCGGCC

Y81D10R (1705 bp)

TCGAAAATTG GGTTGATAAC TAATCTACAG TTGATAATTG AATAGTTGTA GTTGCAATGG
 TTATTTTTCA AAAATTAAT GTATTTTTTA GTTGATATTA GATGACTTTA TTGTTTAAAA
 TCTTTAATTA TTGTGAAAAT TAGGGTAGTT TCAAGACAAT AGGCAAGGrT CCGTAGGCAC
 TTACGGATGT GGATCTGGAT ACTCTTATTA CCTAGTGGAT CCGGGTAGGA TATGGATCCT

TGTCTAAAGT CCAGATCCTA CCCATTGCCA TCTCTATCTA AGGkAGATGA AATGAGTTGC
 GAGACATAGC AGGGGCGATT CTTCGCCCAT ACAGTATAGG CGACGGAATA GGGCCCCAAA
 AATAGAGGGA CCCTAAAATA TATTATATGT ATTAGATGTT TGAAAGAAAC AAAAAAGCAA
 AGCATTGGA TCAGTGATAA AGTGGCGGTC AGGGATGGGA AAAAGGGACG TAGGTTCAAT
 CCTGGTTGGT TAGGAACAAA ATTTATTTAT TTTTATTGTT TTCAATTATG ACATCACATT
 AATAACATCA GTCCATAACC GCATCACTCG TGGTTTTATT TATTCATTTT TTTGCTGCTT
 CAAATTCTCA ATTTTCCATG AATGGCTACT CTTTCTCAT AACTCTCTTT CATTAATTTT
 TACTCATCCT CCTATATTTT TTTTGCAATT TTTCAATAAA AATTATTCTT AAACCTCAAT
 TCAACAAATT TTGTCGGAGA AGTTCAAGAG ATGGGkGATT ATTTTGATAT GATGTAATTA
 GATGTTATTT TAAATATAAA AGTAATTTTT TAATTGAAAA TCTAATTTTT TTAACAAAAA
 TAAATATGAA GGGCCCAATT TCAAAAGAGT GTATGGGACC CTTCACTACA AGAAATTATT
 TCAAAGAGGG CAATATTTAT CAATCAAGGA GGGCAATTAG CTATTTTGCC TTGTCTAATA
 GTATCAAAAA AGACAAATAA AATTCCCCCT TTTTGGATAA TAAAATAAGA AGACAATTTT
 ATCATTGTC CCTATTTGAT ATCmCCTAAr rGGGCTATAT TAAATTTGCC CTCTATAATA
 TTATCTAATA AAACAACCTC ATAAATTTGC CCTTTTAAAA GACmCCTACT AAGGCAATTT
 ATTTGTTTGA TATCTTTGAA AAATTTAArG GACAATTGAA ACATTTTGCC CTCTTTGAAA
 TATATTTAAA AAGGCAATTT ATCTAATTTT GCCCTATTTG AAATTAACATA AGAGGGCAAA
 ATAATGTAAGT GTATTTGTCT TCATTAATAA AAAAAAAAAG TATTTGTCTT CCTTGATATT
 CATAATCCAT AACTTTTTTAA AAGTGGCAAA ATATTTACTG TAGCAATCAA AATATTCATA
 ATCTCTCTCT GAAAGCATCA GCAAGTAACA GATGAAGGGA GGAACCTGAA AAATTAGCAA
 TCAGTCAAAA CTCTCTCTCT CATCTTATGG AGCTTCAATT ATCTCGTCAA TGGCGCCTC
 TGAGACCGTC AATGTATCAT CTTCTAGACA AGCTTGCGGA AATGTACTTG CTGTTTTCAT
 CCTCATATTG ATCGGAGTTC TCGCTTTCTC GATCCGTCTC TTCTCTGTAA CTCTTATAT
 TTCCTTATTC ATTCTTCTAT TTGTAGATCT AATCGTAATT AGGTTATACA AATTCGACGA
 TTTGAAGCTA TGATTTGTTG **AATTC**

Y89F10L (510 bp)

GAATTCAGCT GCAAACCAGC TtCCAGAAGT GGATTCTTTG CCAGATGGTT TTGTTGAGAG
 CCTTCCAGAT TCCATAGCTC CTGTGACACC ATCCAATGAA AAGGAGAAGC CATTACATGA
 ATACAAGATA AATAAATCAA TGGAAGTGA TAGTTCAAAT GATTCAAGCT ATGAAGCATC
 AGTGAATGGA TTCGTTGCGG TTGAAGGAAA AGGGGAGAAG GTTCCCAAAT TGCGCACATT
 TCCGTTCCA TTGTCTGAAA AGGATGGTTA TGACGCATCT GGAGAATCAG CCAATGTCTC
 TGATGATGGC TGCTTGGAGT TGAGAGAAGA TACTTCGGTA ATCAAAGCTG AATCATCTAC
 TTCTGTTTCA GGAGGAACTG ATTTAAGAAC GAGCACCATT AATATGAAAG GTAAAGGTCA
 AACAGAAGTC CAAAGATTTG ATTAGTGTA TACCTCTTA TTCGTGACGT TCTTTTGCAG
 TTTCTTGGTG ATGCTGTGGA TTTCATGGCC

Y89F10R (532 bp)

GGCCTCTTCA ACATGCTTTC TTTTCCTTTC CTTTTTTTTT CTTTCTTCTH CGTCTCTCTG
TCTTTTCTTA GCTGCATTTT CAGCCTCTCT TTTCTTCCTT TCTtCCTCTT TCAATTTTTt
CTTCSGTTCC ATTTCCCTCA TATTTTCTTA CTGTTGGGGA GTTCATTTCA GTCACAAAAT
TATGCCATTA TTGAATTTAT AATTGAACTT TGATGTGCAA TAATAATAAT AAGAGGATTT
AGGAGTGATT CGTGAATTAA TGTGGGTTTT TTTGCTAAGG TTAAAAGCAA GAAAAATTCG
CAAGCCATTA ATTACGAAGt AGAAGAGTTT TTTAACGTTC ATGGTGGATT TGAAGAGGTG
AGAGGGAGGC ATGAGTTATT ACATTTATCA TCTATGACTG GAAGTCTGGA ACTCTCTAAA
TAGGTCTTGA CTCTTGACTG TCATATTATT AATTAAAATG TTATCTGTAA TTTTATGAGA
TTATAAAGCA CTGAAAAACT TTAGATCAGT TGGTGAGATT AGTTGGGAAT **TC**

Y99F8L (503 bp)

GAATTCAGGT AATTTTTTTTT TTACCGTTGA TGTCCGTTTT TATTTTCTTA ATCTTAATGC
TGATTTTCAAT GTCTCATATG TGGAATTCAT TCACTATTTT TACTACAACA ATCTAGTTGC
ATTTCTTAGA ATCAACGTTG GCTCAGTTGG TTGAGAGGCC TCCTTAGTCC TTTCGCTTTT
CTTATAGGGG TTCGATTATA TGCCCACGAG TAAAGTGGAA TCCTAAATTT GTTCCATCTT
GTCTTTAAAA ATAATTTAAA AGAAAATCTA GTTGCATTTT ATAATTTTTT ATTATAGTTG
GTTATATTAT ACATATGTGC CCAAGTTGTT ATGTAAATAA TTCTAATTGT GTTTACAGTT
TGTTAAGTAA TGCCTGTTAA TTATTATTTT GAGAATATCA GGAAAAATCA AGAACTTTTA
GAAAATTTAC AAAGGAGTTC AAGGAAAAAC TTAAACAAAT TTGAAGATTT TGTAACCATT
TTCGAACTGT TAGTTAAGTG GCC

Y99F8R (522 bp)

GGCCCAAAAA AAAAGGTAAG GTGACCTTGT AACTATATGA CGCTACATGA ACGAATAAAC
AAATGTTACT TTAATACAAA AATGTATCTT ACAATATATA TTGTTATGTC ATATGTGGCT
AGCCACACAC AAAACTTGTT GAATTTGTAT AAATCATTTT TTCATCTGGA ATGCTCCACA
TATGTATAAT GTATAATATC AAACAAGTAG TACTTGGTCT AGTGGTAAGA TTTGTATCGT
ACAACCTTGA GGTGTAGGA TCGACCCCC CCCCCCCAC ACTAGAGGTA CTTTATGGTG
AGATTTCTTA ATCCTCCCC ACTCTCAAAG GGTCTTGTCT ATATAGGTGA GTTGGATTAA
CTTGTGCGAG ATTCTGATTC AGCAGGACAC CTCTCCTTAC TAATAAAAAA ATGTTTAATA
TATACCAAAG AATAATAGGA GCAATGAGCT AATTTCTGTT TTTCTAGCTA GATTTAAGAA
AGAATGCCAC TTTTCCTCCA AAAAAAAA ACGAAAGAAT **TC**

Y102H12L (1141 bp)

GAATTCGACT CAAGAAAGAC CTGAGAGTCC AGATTTTGAT GGGGACATGT TTGAGAGAGC
 AGCTAAGATT AAAGTCCCGT ATCTTAAAGG GTAAGCTGAC CCTATCCTCT TAGAGAGTTG
 GATTAGGGAG TTTGAAAAGA TTTTTGGGGC CGCGAACTGT CCTGAGAATA TGAAAGAAGG
 GCAAGTTATA TTATATTTGA AAGATGAGAC TGACTTATAG TAGAAAGAGA ATGAGACTAG
 ATTTAGTATT ATGGAAGAGT TTAATTGGGA ATCCTTTATT GTTGCTTTAA AAATTTTACC
 CTGCTyTTAT GAGGAAACTA AAGGTCCAAG AGTTTATCAA CCTTAGGGTG GAGAGTATGA
 CTATCTCTAA GTATTATAGC AAGTTCATAG CATTGTCTAG ATTTGCAGTT GAAGTAGTAG
 CCACTGAGGA GyTAAATGCT CAGTGATGTG AGCAAGGTTT AACTAAGGAA ATTCAATTGG
 AGTTAGTAGA TTTGGAAGTG AATGATTTGC CTATTAGTAT ACCTACTGGA GAAATCATAA
 GGTGTACCAA GTTGTTTAGA AATCTGCCTT TAAAGATAGG AGGTCGTATC TTTCCGTCTG
 ACTTAATGGA ATTCAATTTG GGAGACCTAG ATGTGATTCT TGGGATGAAC TAGTTGAGTC
 TTTACAAGGC TACCATTGAT TGTGAGATTC AAAAAGGTGG TGTGGAAAT CCTTTGGGAA
 AATTGACATC ATATAGACAT TTCGGGAAAC CTAAGAAGTT TGGAGTTATC TCTGCTATGC
 AAGTAAAGAA ATTGATTGAA AGAGGGTGTG AGTTATTCTT CTGTAGTGTG CAGGATGTGA
 GTAAGGAAGT TGAGTTAAAA CTTGAGGmCG TCCCAATAGT GAACGAGTTT ATGGACGTGT
 TTCCAAGyGA GGTATCAGGT ACGCCGCTG CTAGAGCTGT TGAGTTCACC ATAGACTTAG
 TTCTTGAAC TGCACCTATA TCTAAGGmCm CCTATAGAAT GGCACCTCCT GAGATGAGTG
 AGTTGAAGAC GCAGTTGAAA GAGCTTTTGG ATAAAGGTTA TATTAGGCCT AGTGCATCAC
 CTTGGGGAGC TCCTGTGTTG TTCGTAAAGA AAAAAGATGG AAGTATGAGG TTATGTATCG

A

Y102H12R (833 bp)

GGCCTAAGTA TACACGAACC ACTAACAGCT ACCAGCACAA CTAACAACCTA GTCACACAAC
 TAAAAATACC ACCATATCTA CTGTTGCCGA ACACGCCCTA AGTTTCAAGA AAAGAAGTAG
 GTTATGTCTT CGATGTACAA TTCCAATTAA ACCTGACCCC GGGGAAATGA TGAATCGAGG
 GGCTTAATAT TTAACCCTAA TACACCTTCC GTTAATCTTC CCCCCAAAC ATCCTCACAA
 GTAACCACCA TGGCTCTAAG GCGCCTCCTC TCTCGCTCTC GTGGTTTCCG CCCCATCAG
 TACCACCATC TTCACCGCCT GGCCTCTTCT TCTGCCGTCG CTTCTCCCTC GCCTTCCCT
 CCTCCACCCA CTGCCATGCT CTACGACCGC CTCGCCGAAT CCGTAAAAACA AAAACTAAAT
 CGGCTCTCAA ACCCCGACCC CAAATTCCTA AAACACAACCT CCCCTCACCC AACCTCGCC
 GATCACACCG CTATCCTCAC CTCACCCGCC ACCAAAATCA CTACCCTCCC CAACGGCCTC
 CGCGTCGCCA CTGAGTCACA CCTTGCTGCA CGCACCGCCA CCGTTGGTGT TTGGATTGAT
 GCCGGGTCTC GCTTCGAGAG CGCTGATACT AATGGCACTG CACATTTCTT AGAGCATATG
 ATCTTTAAGG GTACTCATAG AAGATCTGCT AGGCAGCTTG AGGAAGAGAT TGAGAATATG
 GGCGGACATT TGAATGCTTA TACTTCTAGA GAACAGACTA CTTACTTTGC TAAGGTTATG
 GATAAGGATG TTTTAAAGGC GGTGATATT TTGGCTGATA TCTTGCAGAA **TTC**

Y49F7L (375 bp)

GAATTCTCAT GGGTCCACAT AAGTCCATAT GAATTAACTC TAATGGTTTA GTGGTGCTT
 CAATCGTTTT AGATTTGAAA GAGGATCTTA GTTGTTTACC TCGTGCACAT GCATCACATA
 CTTGATCAAT ATGAAATTTT ATAGATGGTA ATCCTAAAAC AAGGTCTTTT GATCTAAGTT
 TCTCAAGTAA TGAAAAGCTA GCATGTCCTA GACGCTTGTG CCATAGAAGT GAATCATCTT
 CAATAACACT AAGACAAGTT AAATTGATTT GAGGAACAAG GTCTAGATCC ACAATGTATG
 TGTTCCCTTT CCTTGTTCTT TCCAACATwA CCTTCTTAGT TTTAATGTTG ATGATTAAGC
 ATTTTTCCTT ATCGA

Y49F7R (1879 bp)

GTCGACGGGC TGTTTGGCTG CTCTTGGACG GTTTCTCTCA AAATCAGGGG ACAAATGTCA
 CCATTTCTTT GCTACCATCA AGAAAAATGC CAAGTTTGAA TGGTCAGATG AAGCTGAAGT
 AGCCCTTCAG CAAGTAAAAG ATCATCTTCG GCAGCTGCCT AGGCTGATCA GTCCGGCCGA
 AGAGAGAGGT TGTATGTGTA TCTGGCTGTA TCACCCTTCG CGGTAAGTGC AGTCCTTTTG
 GCTGAAAGAG AATCGGTGCA AATACCCGTA TATTTTGTGA GCCATGTGCT TAAAGATGCT
 GAGAACAGAT ATTCTACCAT CGAGAAATTC GGCTTGGCCT TGCTGATGGC GAGCCGGAAG
 TTAAGACCTT ACTTCTTAGC TCACAGCATC CTTGTATATA CAGATCAGCC GCTTAGGAAG
 TGTTGCATAA GATGGATGCC TCTGGCCGAA TGCTAAAATG GGCTGTTGAG CTGAATATGT
 TTGATTTAAC ATTTGAGCCT AGAAAGGCAA TCAAGGGCCA GGCTTTGGCT GACTTTATTG
 TAGAGCTTAC TCGGCCTACG ATAGAAACCG TCCAAGATCC AGCAGCAGGA AGGCGTCATT
 GGACCCTTAT GGTGGACGGA TCCTCAACTG CCAACGGATG TGGGGCAGGA ATCATTTTTC
 AATCTCCAGA AGGGGATAAG TTTGAATATG CTATGAAATT CAAGTTCAG GCGTCCAATA
 ATGAGGCAGA GTATGAAGCT CTCTTAGCCG GCATAAAAAT GTGTAAAGCG GCTGGGGCCC
 TGGAAATTGA GGCTAAGACC GACTCTCTGC TGGTTGTCAG TCAGGTCAAT GGTGATTTTG
 AATGCAAGGA GGCGTCCATG AGTAAGTATA TGAATTTGGT CAAGGAAGAG ATCAAGTCTT
 TAAAGAGGTT CGTCTAGAC CAGGTGCCCA GATCAGAAAA CCATCAAGCT GATGCCCTCT
 CTAAACTGGC CAGCTCGGCT GAAGGAGATG TTCCTAGAAC AGTCTTTTGG GAGGTGAAGG
 CGGCCAAGAG CATTGAGGCC GGAGAAGTAC TGTTTCTCAG CCGAGATGAT GAGTGGATGA
 GTCCTATCAT TGAGTTCAAG AAGACTGGCC GTCCGCTCT TGATCCCAT AAGGCCAAGT
 ATGTGAGGGC TAGGGACAAG TGGTTTGAGT TGTGGAATGG GACCTTATAC AAAAAATCCT
 ATAATCGGCC TCTTCTCAAG TGCATCAGCC GAAAGGAAGG TCTGGACGTT TTGAAGGAGT
 TGCATGAGGG AGCTTGTGCT TCTCACATTG GAGGAAGAGC TTTGGCAGAA AGGGCTCTCA
 GGACGGGCTA CTTTTGGCCG ACCTTAAAAG AAGATGCACT CCTCTATGCC AAGAAGTGTG
 ATAGTTGCCA AAAGCATGGT AATATCCATC AAAAGCCGTC CAATTACCTG ACGCCATTC
 TCTTTCCTCT TCCCTTTGCT AAATGGGGGA TGGACATTCT TGGGCCTTTT CCTGTTGCTG
 CCGGCCAGAA GAAATTTGTA ATAGTAGCTG TAGACTACTT TACAAAATGG GTTGAAGCTG
 AAGCCTTAAG GGCATCACC ACCAACGATG TCAAAGGGTT CATTTGGAAG AACTTGATTA
 CAAGTTTTGG CATGCCCCAG TCCATCGTCT TTGATAATGG GCCGCAATTT GAAACGCCCA
 AGCTTCGTCA ATGGTTGGCC GATCAAGGAG TTAAGGCTCA CTTTGCAGCA GTAGCTCATC
 CACAGGCTAA TGGGCAAGTA GAGGCCTTTA ACAAGATCCT TTCGGCCGGA ATAAAAAGA

AGTTAGACAA TGCAAAGGGG CTTTGGGTAG AAGAATTACA GCTGGTCTTA TGGTCAATTA
GGACGACGGC CAAGAATTC

Y85A6L (682 bp)

GAATTCCCTTA AAGATGTAAG TATAAAAGAA TAATGAACTC TTCTATGCTT ATCTCTTGTA
TTATGTATTG ACATATTGTT ATCTTAATCC TCATACACAC CTTAAATAAAA TAATTTTGCT
TTGACATGAT GTAAGTTGAC ATTCCTCCTA CCAACATTTT CACTAAATTA TAAACATTAT
TAAATTTTTG TACACAAGAC ACAAATACA AACAAAGTCGA AGTGACTTAG TGGACTTTGC
CGCTAAACCA AAAACATATT TGTATCCGAA AACACGGTAG CAATTAACCT ACCCTTGATG
GCTTAAGTTA AAATATAACA AACACTTTCT ATAGATACAA AGAAAACAAA TAGGCAACAT
TGTTGTAGAA CTTGGAAAAA GAAATTGTGG CATAGTTTGA ACGAGGACTT GAAATAAAAT
GTTTGCTAGA CAATGAAATC AGTTATTTAT GAAGACATGA GGTAAATATG AACGCAAAAT
GTAGAAAGAT TAAGAAATGT TTTCAATTTAA AACAAATTTG GATAAGAATA ATCTCAATTT
TAGGTTAAAT AAAAAATAAT CCTTTTTGTG GTCTAAAATC TAAATATCGG TCTAAGACCA
TTGTGAATGA CTAAAAGGTC ACGTTCAAGC CATTTGTCCC AAAGAAGGAA AAGTGAAGT
AAATGTGCAT AGAGGACTGG CC

Y85A6R (357 bp)

GAATTCCACA ATTCTTTAGA TGATCATCAA ACTCTTGGCT CAAATATTCA CCACCACGAT
CAGATCGTAG TGCTTTTATT GTCTTACCAA GTTGTAACATA TACTTCATTT TGGAACCTTT
TGAATATATC AAAAGATTCC GACTTATGTT TCATCAAGTA AATATAGCCA TATCTACTCA
AATCATCAGA GAAGGTGATG AAGTAATTAA ACCCTCCCCT TGCCTTTGTG CTCATAGGAC
CACATACATT TGTATGTATG AGTCCTAAAA GATCGTTGGC CCTTTCACCT TTTCCAGTAT
ATGGTGATTT TGTCATCTTG CCCATTAAGC ATGATACACA TACATCAAAT GATTCTGA

Y101A7L (802 bp)

TCGAATTTGA GTTTTAAATC TTGGGTAAGT TTTTGTTTTT AAGAAATATT GCTTTTTTTAG
AGGCTTTTAG CTCAAATCTT TTCTTCCGAA AAAGCGGCCT CAGGCAGCAC CTACCTGCAC
CCATCATAGG TCGCGTTGCC TAGGACTGCC AAGGTGATTT TTCTTGCAAT TGGGCGCGAT
TTTTAAACT AAGATATGTT TGTTTCTTGT TCAAAACTTG AGAAATTTGA TCTAGTGGAA
TCCGAGGGTG TCTATCTTCT TTTTGACGAA CCAAAAAACA CTTGAATTGG ACACTCCATT
CCCCACACG CTCCTATAGG ATCTTGTCGC TTTGATTCAA ATTTGATACA AAATAAGCA
GGgCGGCTCT ATCATTATCA GGCCAGCTTA AATTCTCAA TTTGGGGCCC TTGACTCATA
TTTAAGATAA ATGCACAAAA GTGTTTAACC AAAAACTCAC AAGTTAAGGT TTTGAGGGTG
TTCTTGAGGT CTCAATCACA AAAAAATAAAA GCACAATACT GGAACTATGC AATCAATTC
AGAAATCACA CCCAACAGG CGGACTCTCA ATCTTTGAAC TCAAACAATC TCTAATTCTA

ATTCATGTTG AACGAACCCT TAAATAGAAA TTACACAGGA ATCTTAATCC TAAACTATGA
 TTAAACGACT CCTAATGATC TTAGATCAAG TAAAATCCTC TTTGAAGTGG AATAGAAAAA
 CCCCAGCAAGC AAAAGATTTT TAAGGTAACT AGACTCCTAA CAACTTAAGA GATCTAATAG
 ACTTCTAACA TCATTGAAT TC

Y101A7R (435 bp)

TCGAGTAGAG GCATCAATTA ATACCATGAA ATAACGAAAT GGCCACATG CAGGATGAAT
 AGGCCACAAA ATATCTCCTT GAATTCTTTC TAAAAACATT GGAGATTCAG TGGCAATCTT
 ATTTATAGAT GGTCTGATTA TCAATTTGCC AAGTGAGCAT GCAGATCATG TTAATTCATT
 TGACCGAGGA ATTTTGACAT TCTTTATAGA GTGTCCATTT GAGTTTTCAA TGATTCTATG
 CATCATTCTT GTGCCAGGAT GGCCTAATTG GTCATGCCAT AGAGTAAATG ATTTTCTATT
 ATCTAACTTC TGGTTAGATA TCATATTAAT TTCAATCGGA CGTATATCTA TGCGACAAAAG
 TCCCAGGAA ATTGCTGGCA ATTTTTCATA GATGTATTTT TTGCCGTATT TCTCTGCCGT
 TAGGCATATG AATTC

8.3 Sequenzen verwendeter Primer.

Darstellung in 5'→3'-Orientierung

Y5C6L1 act ttc aca aaa tag cca ag
 Y5C6L2 tag tat tac ttc atg aat gc
 Y5C6R1 tac tat cct cca tat cct cc
 Y5C6R2 ttc ttc cat tgc tgt tgg tc
 Y7A8L2 tag tga aga gca cta cct tc
 Y7A8L3 tta ctg ggg atg tct tag tg
 Y7A8R2 acc ttc ttg ttg att ata cc
 Y7A8R5 tga taa gac ctt tgc tcc tg
 Y29B6L2 tag ata ata gta gta tag gg
 Y29B6L3 ctg gac ctt agc aag tac tc
 Y29B6L4 cac gct cta taa gta gta cc
 Y29B6R1 ttg gta gtg aca gag tac tg
 Y29B6R2 gca tta aac cca tcc aat cc
 Y49F7L1 caa gga aag gga aca cat ac
 Y49F7L2 ttc tca tgg gtc cac ata ag

IR-Y49F7R1	ata gaa agc gtc caa gat cc
IR-Y49F7R2	ggc aac tat cac act tct tg
Y67G1L1	aaa atg agc tta tac agc ac
Y67G1L2	tat tca gac aag tgt tca tc
Y67G1L3	aga att tag aag gtt ttc tc
Y67G1R1	act aat ttt tct ccc cta tg
Y67G1R2	aca cat cct tgt gaa atc ag
Y73G8L1	agt gct aca agc tag atc tc
Y73G8L2	aca tta ccc aac atg aaa gc
Y73G8R1	tag gtc aag tga aga tta gg
Y73G8R2	acc att tca agc gtt gta cg
Y81D10L2	ttc atc aca gtc aaa atg ac
Y81D10L3	ccg tac aga ttt tga tgt tc
Y81D10R1	acc gtc aat gta tca tct tc
Y81D10R2	atc gtc gaa ttt gta taa cc
Y81D10R4	cta gaa gat gat aca ttg ac
IR-Y81D10R7	gat cag tga taa agt ggc gg
Y85A6L2	tct tct atg ctt atc tct tg
Y85A6L3	cat ttt att tca agt cct cg
Y89F10L1	cat gaa atc cac agc atc ac
Y89F10L2	agt gga ttc ttt gcc aga tg
Y89F10L5	gtt ctt aaa tca gtt cct cc
Y89F10R1	agc tgc att ttc agc ctc tc
Y89F10R2	act aat ctc acc aac tga tc
Y89F10R6	taa tat gac agt caa gag tc
Y99F8L1	tta cat aac aac ttg ggc ac
Y99F8L2	ttt cat tgt ctc ata tgt gg
Y99F8R1	agg taa ggt gac ctt gta ac
Y99F8R2	cga aat tag ctc att gct cc
Y101A7L1	caa aaa ctc aca agt taa gg
Y101A7L2	aga tct ctt aag ttg tta gg
Y101A7L3	ggt gat ttt tct tgc aat tg

Y101A7R1 gtc atg cca tag agt aaa tg
Y101A7R2 aat acg gca aga aat aca tc
Y102H12R4 tcc tta tcc ata acc tta gc
Y102H12R9 tca gta cca cca tct tca cc

8.4 Homologie-Ergebnisse der YAC-End-Sequenzen

Die Ergebnisse der Vergleiche der Sequenzen der YAC-Enden mit Datenbank sind in Übersichtsform zusammengestellt.

Homologien zu Y5C6L:

Query Sequence: 5C6L_co.seq gegen PlantDNA (Length: 301)

Database: PlantDNA 213,936 sequences; 198,770,223 total letters.

Sequences producing High-scoring Segment Pairs:	Score	High Probability	Smallest Sum	
			P(N)	N
GenBank MCPPD X82489 M.crystallinum ppd gene. 7/96	340	5.0e-09	1	
GenBank STU60077 U60077 Solanum tuberosum disease resista...	198	0.0078	1	
GenBank AB018111 AB018111 Arabidopsis thaliana genomic DN...	177	0.11	1	
GenBank LEAJ1913 AJ001913 Lycopersicon esculentum phyA ge...	167	0.97	1	
GenBank SLY224357 AJ224357 Lycopersicon esculentum mRNA fo...	163	0.9999	1	

Homologien zu Y5C6R:

Query Sequence: 5c6r_con.seq gegen pdb (Length: 1256)

Database: PlantDNA 185,711 sequences; 169,634,083 total letters.

Sequences producing High-scoring Segment Pairs:	Score	High Probability	Smallest Sum	
			P(N)	N
GenBank NTU08931 U08931 Nicotiana tabacum cryptic seed co...	250	0.037	1	
GenBank ATTS5222 F14300 A. thaliana transcribed sequence;...	188	0.091	1	
GenBank T8F5 AC004512 Arabidopsis thaliana chromosome...	240	0.12	1	
GenBank ATT805 AL021890 Arabidopsis thaliana DNA chromo...	215	0.83	1	
GenBank ATF24J7 AL021768 Arabidopsis thaliana DNA chromo...	204	0.996	1	

Homologien zu Y7A8L:

Query Sequence: 7a8l_con.seq gegen pdb (Length: 1030)

Database: PlantDNA 185,711 sequences; 169,634,083 total letters.

Sequences producing High-scoring Segment Pairs:	High Score	Smallest Sum	
		High Probability P(N)	N
GenBank LEU81378 U81378 Lycopersicon esculentum disease ...	288	0.00045	1
GenBank PWU02970 U02970 Prototheca wickerhamii 263-11 co...	282	0.00086	1
GenBank AC006418 AC006418 *** SEQUENCING IN PROGRESS ***...	267	0.0043	1
GenBank ATAC005819 AC005819 Arabidopsis thaliana chromosom...	267	0.0044	1
GenBank B22209 B22209 F17M1TR IGF Arabidopsis thaliana...	212	0.0053	1
GenBank T14P8 AF069298 Arabidopsis thaliana BAC T14P8...	258	0.011	1
GenBank ATFCA3 Z97338 Arabidopsis thaliana DNA chromos...	257	0.013	1
GenBank AC005405 AC005405 BAC F18A17 from chromosome V c...	253	0.020	1
GenBank AC005964 AC005964 Arabidopsis thaliana chromosom...	252	0.022	1
GenBank AB015476 AB015476 Arabidopsis thaliana genomic D...	251	0.024	1
GenBank AB016879 AB016879 Arabidopsis thaliana genomic D...	246	0.040	1
GenBank ATAC005396 AC005396 Arabidopsis thaliana chromosom...	246	0.040	1
GenBank ATAC004705 AC004705 Arabidopsis thaliana chromosom...	246	0.041	1
GenBank AC006233 AC006233 *** SEQUENCING IN PROGRESS ***...	243	0.055	1
GenBank T24M8 AF077409 Arabidopsis thaliana BAC T24M8...	241	0.069	1
GenBank ATAC004484 AC004484 Arabidopsis thaliana chromosom...	237	0.10	1
GenBank AC006260 AC006260 *** SEQUENCING IN PROGRESS ***...	234	0.14	1
GenBank ATAC005167 AC005167 Arabidopsis thaliana chromosom...	234	0.14	1
GenBank AB015474 AB015474 Arabidopsis thaliana genomic D...	232	0.17	1
GenBank AB012246 AB012246 Arabidopsis thaliana genomic D...	230	0.21	1
GenBank ATAC005169 AC005169 Arabidopsis thaliana chromosom...	229	0.23	1
GenBank AC005275 AC005275 Arabidopsis thaliana BAC F4C21...	228	0.25	1
GenBank D88193 D88193 Brassica rapa DNA for S-receptor...	224	0.35	1
GenBank AC006067 AC006067 *** SEQUENCING IN PROGRESS ***...	224	0.35	1
GenBank B77525 B77525 T26I20TR TAMU Arabidopsis thalia...	215	0.39	1
GenBank LETPSI1 X99214 L.esculentum TPSI1 gene. 4/97	221	0.40	1
GenBank ATAC004136 AC004136 Arabidopsis thaliana chromosom...	220	0.49	1
GenBank ATAC005957 AC005957 Arabidopsis thaliana chromosom...	220	0.49	1
GenBank AC004146 AC004146 Arabidopsis thaliana chromosom...	219	0.53	1
GenBank C97700 C97700 Oryza sativa cDNA, partial seque...	166	0.54	1
GenBank AQ163646 AQ163646 nbxb0007B21r CUGI Rice BAC Lib...	209	0.54	1
GenBank ATF24J7 AL021768 Arabidopsis thaliana DNA chrom...	216	0.64	1
GenBank ATFCA8 Z97343 Arabidopsis thaliana DNA chromos...	216	0.64	1
GenBank AB015477 AB015477 Arabidopsis thaliana genomic D...	215	0.68	1

GenBank ATAC002521 AC002521 Arabidopsis thaliana chromosom...	215	0.69	1
GenBank AB013392 AB013392 Arabidopsis thaliana genomic D...	215	0.69	1
GenBank ATAC002332 AC002332 Arabidopsis thaliana chromosom...	215	0.69	1
GenBank AQ272846 AQ272846 nbxb0028D18r CUGI Rice BAC Lib...	208	0.71	1
GenBank AC002354 AC002354 Arabidopsis thaliana BAC F6P23...	214	0.72	1
GenBank AC006420 AC006420 *** SEQUENCING IN PROGRESS ***...	213	0.76	1
GenBank AC006161 AC006161 *** SEQUENCING IN PROGRESS ***...	213	0.76	1
GenBank CHMPXX X04465 Liverwort Marchantia polymorpha ...	213	0.76	1
GenBank ATFCA5 Z97340 Arabidopsis thaliana DNA chromos...	213	0.76	1
GenBank AQ325832 AQ325832 nbxb0021F14f CUGI Rice BAC Lib...	206	0.78	1
GenBank CHNTXX Z00044 Tobacco chloroplast genome DNA. ...	211	0.83	1
GenBank AQ290272 AQ290272 nbxb0036L03f CUGI Rice BAC Lib...	202	0.84	1
GenBank BOSRKL Z18921 B.oleracea gene for S-receptor k...	209	0.88	1
GenBank AHCHI2NO1 X82329 A.hypogaea chi2.1 gene for chiti...	208	0.89	1
GenBank ATAC004482 AC004482 Arabidopsis thaliana chromosom...	209	0.89	1
GenBank AC002396 AC002396 Arabidopsis thaliana chromosom...	207	0.93	1
GenBank ATF28M20 AL031004 Arabidopsis thaliana DNA chrom...	207	0.93	1
GenBank AQ258712 AQ258712 nbxb0021G05f CUGI Rice BAC Lib...	201	0.95	1
GenBank AF074021 AF074021 Arabidopsis thaliana BAC F4H6,...	205	0.96	1
GenBank ATAC004411 AC004411 Arabidopsis thaliana chromosom...	205	0.96	1
GenBank AC006194 AC006194 *** SEQUENCING IN PROGRESS ***...	205	0.97	1
GenBank AB006703 AB006703 Arabidopsis thaliana genomic D...	203	0.98	1
GenBank ATAC004747 AC004747 Arabidopsis thaliana chromosom...	203	0.98	1
GenBank IG002P16 AF007270 Arabidopsis thaliana BAC IG002...	203	0.98	1
GenBank AQ290267 AQ290267 nbxb0036J21f CUGI Rice BAC Lib...	153	0.99	2
GenBank AF001002 AF001002 Lycopersicon esculentum polyga...	202	0.99	1
GenBank B26581 B26581 T11B1TR TAMU Arabidopsis thalian...	196	0.99	1
GenBank AB005248 AB005248 Arabidopsis thaliana genomic D...	202	0.99	1
GenBank AB009054 AB009054 Arabidopsis thaliana genomic D...	202	0.990	1
GenBank AQ291042 AQ291042 nbxb0038M01r CUGI Rice BAC Lib...	194	0.997	1
GenBank AQ250406 AQ250406 T4P20-Sp6 TAMU Arabidopsis tha...	189	0.998	1
GenBank AB012248 AB012248 Arabidopsis thaliana genomic D...	199	0.998	1
GenBank AA824812 AA824812 CT109.complete Tomato Leaf cDN...	148	0.999	1
GenBank B24796 B24796 F22D18TR IGF Arabidopsis thalian...	156	0.999	1
GenBank AI055208 AI055208 coau0003F15 Cotton Boll Abscis...	192	0.9992	1
GenBank AC006135 AC006135 *** SEQUENCING IN PROGRESS ***...	197	0.9996	1
GenBank BNDNAM X67838 B.napus DNA for myrosinase. 11/96	196	0.9997	1
GenBank AB018109 AB018109 Arabidopsis thaliana genomic D...	195	0.99994	1
GenBank ATF23E12 AL022604 Arabidopsis thaliana DNA chrom...	195	0.99994	1
GenBank YUP8H12R AC002986 Arabidopsis thaliana chromosom...	195	0.99994	1
GenBank AB006700 AB006700 Arabidopsis thaliana genomic D...	195	0.99994	1

Homologien zu Y7A8R:

Query Sequence: 7A8rcons.seq gegen pdb (Length: 202)

Database: PlantDNA 185,527 sequences; 168,664,634 total letters.

Sequences producing High-scoring Segment Pairs:	High Score	Smallest Sum	
		Probability P(N)	N
GenBank AQ051548 AQ051548 nbxb0002bH02f CUGI Rice BAC Li...	371	2.4e-11	1
GenBank AQ273653 AQ273653 nbxb0030N07r CUGI Rice BAC Lib...	360	6.1e-11	1
GenBank AQ273673 AQ273673 nbxb0030P07r CUGI Rice BAC Lib...	360	6.1e-11	1
GenBank AQ050423 AQ050423 nbxb0004aA12f CUGI Rice BAC Li...	362	7.5e-11	1
GenBank AQ288661 AQ288661 nbxb0018B21f CUGI Rice BAC Lib...	362	9.4e-11	1
GenBank AQ271435 AQ271435 nbxb0025F04f CUGI Rice BAC Lib...	350	2.8e-10	1
GenBank AQ273644 AQ273644 nbxb0030L23f CUGI Rice BAC Lib...	334	9.3e-10	1
GenBank AQ291843 AQ291843 nbxb0040K05f CUGI Rice BAC Lib...	334	2.3e-09	1
GenBank AQ251087 AQ251087 F18F12-Sp6 IGF Arabidopsis tha...	324	3.0e-09	1
GenBank ZMU41000 U41000 Zea mays copia-type retroelement...	318	4.2e-08	1
GenBank ZMU68408 U68408 Zea mays retrotransposon Opie-2 ...	313	7.0e-08	1
GenBank AQ158132 AQ158132 nbxb0010P09r CUGI Rice BAC Lib...	284	2.8e-07	1
GenBank B29804 B29804 T17E13TFC TAMU Arabidopsis thali...	274	9.1e-07	1
GenBank AC006228 AC006228 *** SEQUENCING IN PROGRESS ***...	274	4.3e-06	1
GenBank MTATRT1 X91201 A.thaliana mitochondrial DNA for...	267	6.0e-06	1
GenBank MIATGENB Y08502 A.thaliana mitochondrial genome,...	267	8.9e-06	1
GenBank B28343 B28343 F15A10TF IGF Arabidopsis thalian...	247	2.0e-05	1
GenBank AB019224 AB019224 *** SEQUENCING IN PROGRESS ***...	258	2.3e-05	1
GenBank ATAC002391 AC002391 Arabidopsis thaliana chromosom...	241	0.00013	1
GenBank AC006250 AC006250 *** SEQUENCING IN PROGRESS ***...	240	0.00015	1
GenBank AF074021 AF074021 Arabidopsis thaliana BAC F4H6,...	238	0.00018	1
GenBank AC006219 AC006219 *** SEQUENCING IN PROGRESS ***...	237	0.00020	1
GenBank AQ272489 AQ272489 nbxb0028E15f CUGI Rice BAC Lib...	225	0.00024	1
GenBank AC005508 AC005508 Arabidopsis thaliana chromosom...	233	0.00030	1
GenBank AC000348 AC000348 Genomic sequence for Arabidops...	233	0.00030	1
GenBank AQ291976 AQ291976 nbxb0041A03r CUGI Rice BAC Lib...	225	0.00034	1
GenBank AB018112 AB018112 *** SEQUENCING IN PROGRESS ***...	231	0.00037	1
GenBank AQ289121 AQ289121 nbxb0034B01f CUGI Rice BAC Lib...	218	0.00066	1
GenBank B61830 B61830 T19E17TF TAMU Arabidopsis thalia...	213	0.00090	1
GenBank PETTBS M23378 P.hybrida DNA which leads to inc...	220	0.00096	1
GenBank AQ271886 AQ271886 nbxb0026H16r CUGI Rice BAC Lib...	211	0.0016	1
GenBank ATAC005171 AC005171 Arabidopsis thaliana chromosom...	213	0.0024	1
GenBank AQ050186 AQ050186 nbxb0003cC01r CUGI Rice BAC Li...	205	0.0030	1
GenBank B27698 B27698 T14O3TRB TAMU Arabidopsis thalia...	199	0.0034	1

GenBank AQ291057 AQ291057 nbxb0038M19r CUGI Rice BAC Lib...	197	0.0072	1
GenBank AC005825 AC005825 *** SEQUENCING IN PROGRESS ***...	200	0.0094	1
GenBank NTTNT194 X13777 Tobacco DNA for retroviral-like ...	192	0.020	1
GenBank AQ290614 AQ290614 nbxb0037K08r CUGI Rice BAC Lib...	187	0.021	1
GenBank AC006248 AC006248 *** SEQUENCING IN PROGRESS ***...	187	0.036	1
GenBank AQ290569 AQ290569 nbxb0037E18f CUGI Rice BAC Lib...	178	0.045	1
GenBank AQ156970 AQ156970 nbxb0008B10r CUGI Rice BAC Lib...	178	0.046	1
GenBank AQ288748 AQ288748 nbxb0033D15r CUGI Rice BAC Lib...	178	0.047	1
GenBank AQ156043 AQ156043 nbxb0002K05r CUGI Rice BAC Lib...	178	0.052	1
GenBank AQ291792 AQ291792 nbxb0040C07r CUGI Rice BAC Lib...	178	0.054	1
GenBank AQ287682 AQ287682 nbxb0031G03r CUGI Rice BAC Lib...	178	0.056	1
GenBank AQ051014 AQ051014 nbxb0004dF12f CUGI Rice BAC Li...	178	0.057	1
GenBank AI054467 AI054467 coau0001B04 Cotton Boll Abscis...	170	0.11	1
GenBank D88393 D88393 Oryza sativa transgene, right bo...	173	0.13	1
GenBank D88394 D88394 Oryza sativa retrotransposon Tos1...	173	0.13	1
GenBank COTMAT5A M86213 Cotton 2S albumin storage protei...	170	0.18	1
GenBank AC006192 AC006192 Arabidopsis thaliana BAC T24G3...	168	0.23	1
GenBank AQ050901 AQ050901 nbxb0004cH04f CUGI Rice BAC Li...	160	0.33	1
GenBank AB010075 AB010075 Arabidopsis thaliana genomic D...	159	0.49	1
GenBank ATF6H11 AL021684 Arabidopsis thaliana DNA chrom...	159	0.49	1
GenBank ATAC005561 AC005561 Arabidopsis thaliana chromosom...	156	0.60	1
GenBank VCOSSER X69552 V.carteri copia-like retrotransp...	155	0.62	1
GenBank AB019226 AB019226 *** SEQUENCING IN PROGRESS ***...	153	0.71	1
GenBank PWU02970 U02970 Prototheca wickerhamii 263-11 co...	152	0.75	1
GenBank ATCATAL X94447 A.thaliana cat gene for catalase...	143	0.96	1
GenBank ATM4E13 AL022023 Arabidopsis thaliana DNA chrom...	143	0.97	1
GenBank MTATRT8 X91208 A.thaliana mitochondrial DNA for...	132	0.97	1
GenBank ATAC001645 AC001645 Arabidopsis thaliana chromosom...	142	0.98	1
GenBank AQ156990 AQ156990 nbxb0008D14r CUGI Rice BAC Lib...	134	0.997	1
GenBank AQ256624 AQ256624 nbxb0016J01f CUGI Rice BAC Lib...	133	0.997	1
GenBank AB010077 AB010077 Arabidopsis thaliana genomic D...	137	0.999	1
GenBank B30202 B30202 T29L18TRD TAMU Arabidopsis thali...	132	0.9992	1
GenBank AQ331276 AQ331276 nbxb0049K05f CUGI Rice BAC Lib...	133	0.9992	1
GenBank B28409 B28409 F18G15TF IGF Arabidopsis thalian...	132	0.9994	1
GenBank NTRRR11 Y10861 N.tabacum mRNA for ribonucleotid...	134	0.9997	1

Homologien zu Y29B6L:

Query Sequence: 29B6L_co.seq gegen PlantDB (Length: 1145)

Database: PlantDNA 380,876 sequences; 311,626,995 total letters.

Sequences producing High-scoring Segment Pairs:		High Score	Smallest Sum Probability P(N)	N
GB:LTZ95378	Z95378 L.terrestris 26S rRNA gene. 5/1997	461	3.7e-12	1
GB:TUZ95385	Z95385 T.usneae 26S rRNA gene. 5/1997	460	4.2e-12	1
GB:TEZ95379	Z95379 T.erici 26S rRNA gene. 5/1997	459	4.6e-12	1
GB:AI495385	AI495385 sa97c12.y1 Gm-c1004 Glycine max cD...	403	1.3e-11	1
GB:AQ629002	AQ629002 T120021g Medicago truncatula PCR p...	403	1.7e-11	1
GB:AI496006	AI496006 sa94d07.y1 Gm-c1004 Glycine max cD...	403	1.9e-11	1
GB:H76515	H76515 18220 Lambda-PRL2 Arabidopsis thalia...	396	2.1e-11	1
GB:AA041052	AA041052 24318 CD4-13 Arabidopsis thaliana ...	394	2.1e-11	1
GB:AI776854	AI776854 EST257954 tomato resistant, Cornel...	394	2.2e-11	1
GB:AI496528	AI496528 sb08h10.y1 Gm-c1004 Glycine max cD...	403	2.2e-11	1
GB:AI740024	AI740024 605075G05.x1 605 - Endosperm cDNA ...	394	2.2e-11	1
GB:AI855203	AI855203 603009H11.x1 603 - stressed root c...	394	2.2e-11	1
GB:AI833387	AI833387 605088G04.x2 605 - Endosperm cDNA ...	394	2.4e-11	1
GB:AI666075	AI666075 606004D09.x1 606 - Ear tissue cDNA...	394	2.6e-11	1
GB:AA753570	AA753570 97BS0045 Rice Immature Seed Lambda...	394	2.6e-11	1
GB:AU076008	AU076008 AU076008 Rice callus Oryza sativa ...	394	2.8e-11	1
GB:AU069986	AU069986 AU069986 Rice panicle shorter than...	394	2.9e-11	1
GB:C95273	C95273 C95273 Citrus unshiu Miyagawa-wase m...	394	3.1e-11	1
GB:TGZ95382	Z95382 T.gelatinosa 26S rRNA gene. 5/1997	442	3.1e-11	1
GB:TIZ95383	Z95383 T.impressa 26S rRNA gene. 5/1997	442	3.1e-11	1
GB:TAZ95380	Z95380 T.asymmetrica 26S rRNA gene. 5/1997	442	3.1e-11	1
GB:AI483219	AI483219 EST242696 tomato shoot, Cornell Ly...	394	3.2e-11	1
GB:AU070343	AU070343 AU070343 Rice green shoot Oryza sa...	394	3.3e-11	1
GB:AU070345	AU070345 AU070345 Rice green shoot Oryza sa...	394	3.3e-11	1
GB:AU070340	AU070340 AU070340 Rice green shoot Oryza sa...	394	3.4e-11	1
GB:TJZ95384	Z95384 T.jamesii 26S rRNA gene. 5/1997	441	3.4e-11	1
GB:AU076007	AU076007 AU076007 Rice callus Oryza sativa ...	394	3.4e-11	1
GB:AU069201	AU069201 AU069201 Rice callus Oryza sativa ...	394	3.9e-11	1
GB:AA394380	AA394380 25963 Lambda-PRL2 Arabidopsis thal...	394	4.1e-11	1
GB:AU069048	AU069048 AU069048 Rice callus Oryza sativa ...	394	4.1e-11	1
GB:AU069647	AU069647 AU069647 Rice callus Oryza sativa ...	394	4.3e-11	1
GB:H37358	H37358 15487 Lambda-PRL2 Arabidopsis thalia...	389	4.3e-11	1
GB:TAZ95381	Z95381 T.arboricola 26S rRNA gene. 5/1997	438	4.9e-11	1
GB:CHLLSURRNA	D17810 Chlorella ellipsoidea gene for large...	443	5.3e-11	1

GB:AI746093	AI746093 605080B04.x1 605 - Endosperm cDNA ...	385	6.0e-11	1
GB:T43542	T43542 6805 Lambda-PRL2 Arabidopsis thalian...	387	7.1e-11	1
GB:T88179	T88179 11875 Lambda-PRL2 Arabidopsis thalia...	387	8.5e-11	1
GB:AU069096	AU069096 AU069096 Rice callus Oryza sativa ...	381	1.2e-10	1
GB:AW010943	AW010943 ST13F05 Pine TriplEx shoot tip lib...	375	2.1e-10	1
GB:AF036489	AF036489 Ephedra distachya large subunit 26...	430	2.1e-10	1
GB:AI770708	AI770708 606056D05.x2 606 - Ear tissue cDNA...	368	5.1e-10	1
GB:FH25SRRNA	X99331 F.hygrometrica 25S rRNA gene. 10/1997	421	5.8e-10	1
GB:T18649	T18649 5c07c09-t7 membrane-free polysomes f...	368	6.3e-10	1
GB:FHRRNA	X80212 F.hygrometrica gene for 18S rRNA, 5....	421	6.8e-10	1
GB:AB021684	AB021684 Marchantia polymorpha genes for 26...	421	6.9e-10	1
GB:AF036488	AF036488 Gnetum gnemon large subunit 26S ri...	419	7.1e-10	1
GB:D42910	D42910 D42910 Rice callus cDNA (H.Uchimiya)...	365	8.5e-10	1
GB:RIC49306	D17770 Rice DNA for 25S ribosomal RNA, part...	365	8.5e-10	1
GB:AI778823	AI778823 EST259702 tomato susceptible, Corn...	366	8.6e-10	1
GB:AI444719	AI444719 486015E11.x5 486 - leaf primordia ...	360	8.8e-10	1
GB:AU069646	AU069646 AU069646 Rice callus Oryza sativa ...	359	1.4e-09	1
GB:BNARNAS	D10840 Brassica napus genes for 5.8S and 25...	412	1.6e-09	1
GB:AF036494	AF036494 Eucryphia lucida large subunit 26S...	403	4.0e-09	1
GB:N37514	N37514 18741 Lambda-PRL2 Arabidopsis thalia...	342	6.5e-09	1
GB:AA752960	AA752960 97AS1415 Rice Immature Seed Lambda...	366	6.7e-09	1
GB:AI731793	AI731793 BNLGH110905 Six-day Cotton fiber G...	372	9.2e-09	1
GB:AF036490	AF036490 Acorus gramineus large subunit 26S...	394	1.1e-08	1
GB:AF036492	AF036492 Plumbago auriculata large subunit ...	394	1.1e-08	1
GB:AF036498	AF036498 Saxifraga mertensiana large subuni...	394	1.1e-08	1
GB:AF036495	AF036495 Hamamelis virginiana large subunit...	394	1.1e-08	1
GB:AF036502	AF036502 Mitella pentandra large subunit 26...	394	1.1e-08	1
GB:AF036500	AF036500 Tellima grandiflora large subunit ...	394	1.1e-08	1
GB:AF036496	AF036496 Parnassia fimbriata large subunit ...	394	1.1e-08	1
GB:RICRGHA	M11585 Rice 25S ribosomal RNA gene. 4/1993	394	1.1e-08	1
GB:LE25SRIB	X13557 Tomato 25S ribosomal RNA gene. 7/1999	394	1.1e-08	1
GB:CLRRN26	X05910 Citrus limon cistron for 26S ribosom...	394	1.1e-08	1
GB:AT3RRNA	X52320 Arabidopsis thaliana genes for 5.8S ...	394	1.1e-08	1
GB:ATRDNAF	X52322 A.thaliana rRNA repeat unit, most fr...	394	1.2e-08	1
GB:AC006837	AC006837 Arabidopsis thaliana chromosome II...	394	1.3e-08	1
GB:AC004708	AC004708 CIC5B11.1 check: 4870 from: 1 to: ...	394	1.3e-08	1
GB:N65222	N65222 20262 Lambda-PRL2 Arabidopsis thalia...	344	1.4e-08	1
GB:AF036493	AF036493 Tragopogon dubius large subunit 26...	389	1.8e-08	1
GB:FA26SRN	X58118 F.ananassa 26s rRNA gene. 4/1991	388	2.0e-08	1
GB:SA25SR	X57137 Sinapis alba gene for 25S rRNA. 10/1998	388	2.0e-08	1
GB:SARIBRNA	X66325 S.alba 18S, 5.8S & 25S rRNA genes. 1...	388	2.4e-08	1
GB:AF036499	AF036499 Peltoboykinia tellimoides large su...	385	2.8e-08	1
GB:AF036497	AF036497 Jepsonia parryi large subunit 26S ...	385	2.8e-08	1

GB:AF036491	AF036491	Drimys winteri large subunit 26S r...	385	2.8e-08	1
GB:AI600759	AI600759	486068C06.x1 486 - leaf primordia ...	329	3.1e-08	1
GB:AF036501	AF036501	Lithophragma trifoliata large subu...	384	3.2e-08	1
GB:AU070174	AU070174	AU070174 Rice root Oryza sativa cD...	320	7.2e-08	1
GB:CNS00RJI	AL087180	Arabidopsis thaliana genome survey...	308	2.6e-07	1
GB:CNS00P34	AL083998	Arabidopsis thaliana genome survey...	308	3.4e-07	1
GB:CNS00R35	AL086591	Arabidopsis thaliana genome survey...	303	6.0e-07	1
GB:AA712899	AA712899	32458 Lambda-PRL2 Arabidopsis thal...	304	8.4e-07	1
GB:ATF2206	AL050300	Arabidopsis thaliana DNA chromosom...	354	9.9e-07	1
GB:AI736644	AI736644	sb31f06.y1 Gm-cl012 Glycine max cD...	288	2.7e-06	1
GB:AQ050079	AQ050079	nbxb0003bc02r CUGI Rice BAC Librar...	318	1.2e-05	1
GB:AQ010491	AQ010491	F23L8TFB IGF Arabidopsis thaliana ...	315	1.4e-05	1
GB:B28415	B28415	F18G24TF IGF Arabidopsis thaliana ge...	308	3.5e-05	1
GB:ATAC007288	AC007288	Arabidopsis thaliana chromosome II...	315	6.4e-05	1
GB:ATAC007295	AC007295	Arabidopsis thaliana chromosome II...	315	6.4e-05	1
GB:GHCHI2A	Z68152	G.hirsutum chitinase gene (2439 bp)....	303	0.00018	1
GB:CNS00PY5	AL085115	Arabidopsis thaliana genome survey...	250	0.00027	1
GB:AB015477	AB015477	Arabidopsis thaliana genomic DNA, ...	301	0.00029	1
GB:ATAC005936	AC005936	Arabidopsis thaliana chromosome II...	300	0.00032	1
GB:AQ051567	AQ051567	nbxb0002ca02r CUGI Rice BAC Librar...	283	0.00034	1
GB:ATAC005693	AC005693	Arabidopsis thaliana chromosome II...	299	0.00036	1
GB:AQ291042	AQ291042	nbxb0038M01r CUGI Rice BAC Library...	288	0.00036	1
GB:VFNOD2832	Z68102	V.faba nodulin 28/32 gene. 11/1996	297	0.00039	1

Warning: Descriptions of 347 database sequences were not reported due to the limiting value of parameter V = 100.

Homologien zu Y29B6R:

Query Sequence: 29b6rcon.seq gegen Plant DNA (Length: 923)

Database: PlantDNA 185,527 sequences; 168,664,634 total letters.

		Smallest		
		Sum		
		High	Probability	
Sequences producing High-scoring Segment Pairs:		Score	P(N)	N
GenBank ATFCA4 Z97339	Arabidopsis thaliana DNA chromos...	286	0.00052	1
GenBank B12984 B12984	T24I16-Sp6.1 TAMU Arabidopsis th...	256	0.0085	1
GenBank B67858 B67858	T24L17TR TAMU Arabidopsis thalia...	246	0.015	1
GenBank AB016878 AB016878	Arabidopsis thaliana genomic D...	251	0.022	1
GenBank AC005489 AC005489	Genomic sequence for Arabidops...	229	0.22	1
GenBank B08713 B08713	T32C6-T7 TAMU Arabidopsis thalia...	212	0.59	1

GenBank B23470 B23470 F24L9TFB IGF Arabidopsis thalian...	199	0.85	1
GenBank ATAC005315 AC005315 Arabidopsis thaliana chromosom...	201	0.992	1
GenBank AQ272406 AQ272406 nbxb0027N20f CUGI Rice BAC Lib...	191	0.9995	1

Homologien zu Y49F7L:

Query Sequence: 49F7L_co.seq gegen PlantDNA (Length: 375)

Database: PlantDNA 213,936 sequences; 198,770,223 total letters.

		Smallest		
		Sum		
		High	Probability	
Sequences producing High-scoring Segment Pairs:		Score	P(N)	N
GenBank ZMU41000 U41000 Zea mays copia-type retroelement...	225	0.00079	1	
GenBank AC006601 AC006601 Arabidopsis thaliana chromosom...	209	0.051	1	
GenBank AC006194 AC006194 Arabidopsis thaliana 'TAMU' BA...	196	0.44	1	
GenBank F5F19 AC006216 Arabidopsis thaliana chromosom...	190	0.76	1	
GenBank AC007170 AC007170 Arabidopsis thaliana 'IGF' BAC...	188	0.85	1	
GenBank T4B21 AF118223 Arabidopsis thaliana BAC T4B21...	183	0.98	1	
GenBank ATF20D10 AL035538 Arabidopsis thaliana DNA chrom...	182	0.99	1	
GenBank ATAC005314 AC005314 Arabidopsis thaliana chromosom...	177	0.9997	1	
GenBank AC006841 AC006841 Arabidopsis thaliana 'IGF' BAC...	176	0.99991	1	

Homologien zu Y49F7R:

Query Sequence: 49F7R_co.seq gegen PlantDNA (Length: 1879)

Database: PlantDNA 236,816 sequences; 218,395,540 total letters.

		Smallest		
		Sum		
		High	Probability	
Sequences producing High-scoring Segment Pairs:		Score	P(N)	N
GenBank AF049110 AF049110 Zea mays retrotransposon Cinfu...	636	4.4e-36	3	
GenBank T7M24 AF077408 Arabidopsis thaliana BAC T7M24...	662	1.2e-20	1	
GenBank AF098806 AF098806 Sorghum bicolor Gypsy-Ty3 type...	630	3.3e-19	1	
GenBank AF114171 AF114171 Sorghum bicolor BAC clone 25.M...	630	3.6e-19	1	
GenBank ATAC007209 AC007209 Arabidopsis thaliana chromosom...	601	7.8e-18	1	
GenBank AC006085 AC006085 Arabidopsis thaliana chromosom...	439	8.6e-17	2	
GenBank ATAC006067 AC006067 Arabidopsis thaliana chromosom...	370	4.7e-16	2	
GenBank AQ050469 AQ050469 nbxb0004aE04r CUGI Rice BAC Li...	493	9.0e-16	1	

GenBank NTSTR246N X80830 N.tabacum str246N gene. 1/95	527	1.6e-14	1
GenBank B98573 B98573 F16J4TRB IGF Arabidopsis thalian...	455	7.5e-14	1
GenBank ATAC006920 AC006920 Arabidopsis thaliana chromosom...	509	1.3e-13	1
GenBank AQ271528 AQ271528 nbxb0026G19r CUGI Rice BAC Lib...	442	2.6e-13	1
GenBank AQ287578 AQ287578 nbxb0013P19f CUGI Rice BAC Lib...	425	1.6e-12	1
GenBank AQ329335 AQ329335 nbxb0044F20f CUGI Rice BAC Lib...	415	4.2e-12	1
GenBank ZDGRAND14 X97604 Z.diploperennis DNA for Grandel-...	461	2.0e-11	1
GenBank AQ366273 AQ366273 nbxb0065F11r CUGI Rice BAC Lib...	436	2.5e-11	1
GenBank AQ362392 AQ362392 nbxb0049D16r CUGI Rice BAC Lib...	441	2.7e-11	1
GenBank AC006268 AC006268 Arabidopsis thaliana BAC T24G2...	456	3.6e-11	1
GenBank IG010A02 AF147259 Arabidopsis thaliana BAC IG010...	440	2.0e-10	1
GenBank ATAC006429 AC006429 Arabidopsis thaliana chromosom...	318	3.3e-10	2
GenBank AC007505 AC007505 Arabidopsis thaliana chromosom...	435	3.3e-10	1
GenBank AQ273624 AQ273624 nbxb0030L01f CUGI Rice BAC Lib...	370	5.3e-10	1
GenBank AC007155 AC007155 Arabidopsis thaliana 'IGF' BAC...	348	1.3e-09	2
GenBank NTTDNAINT Z71319 N.tabacum DNA (T-DNA integration...	416	2.1e-09	1
GenBank AQ291965 AQ291965 nbxb0040010r CUGI Rice BAC Lib...	380	2.2e-08	1
GenBank AQ326454 AQ326454 nbxb0034H06f CUGI Rice BAC Lib...	363	2.4e-08	2
GenBank AQ288303 AQ288303 nbxb0032J24f CUGI Rice BAC Lib...	341	1.0e-07	1
GenBank AQ273986 AQ273986 nbxb0032G01r CUGI Rice BAC Lib...	357	1.1e-07	1
GenBank AF095730 AF095730 Glycine max retroelement diasp...	378	1.1e-07	1
GenBank ATAC006437 AC006437 Arabidopsis thaliana chromosom...	342	1.2e-07	2
GenBank ATAC006586 AC006586 Arabidopsis thaliana chromosom...	377	1.5e-07	1
GenBank B97939 B97939 F21L16TRB IGF Arabidopsis thalia...	317	1.7e-07	1
GenBank AB023436 AB023436 Hordeum vulgare DNA, down stre...	371	2.7e-07	1
GenBank B24657 B24657 F21G10TR IGF Arabidopsis thalian...	314	3.0e-07	1
GenBank AB023031 AB023031 Arabidopsis thaliana genomic D...	370	3.1e-07	1
GenBank B97942 B97942 F21L22TRB IGF Arabidopsis thalia...	300	1.3e-06	1
GenBank AQ329733 AQ329733 nbxb0045L13r CUGI Rice BAC Lib...	345	1.5e-06	1
GenBank AQ291329 AQ291329 nbxb0038J08f CUGI Rice BAC Lib...	325	2.0e-06	1
GenBank ATAC006918 AC006918 Arabidopsis thaliana chromosom...	352	2.1e-06	1
GenBank NTDNAH83R Y12536 N.tabacum DNA fragment next to a...	348	2.6e-06	1
GenBank AC005142 AC005142 Arabidopsis thaliana BAC T5L23...	349	2.9e-06	1
GenBank AQ272611 AQ272611 nbxb0028A24r CUGI Rice BAC Lib...	325	3.3e-06	1
GenBank AQ365452 AQ365452 nbxb0063F22f CUGI Rice BAC Lib...	328	4.4e-06	1
GenBank AQ368195 AQ368195 toxb0001N04f CUGI Tomato BAC L...	329	4.4e-06	1
GenBank AQ292119 AQ292119 nbxb0042E20r CUGI Rice BAC Lib...	323	1.3e-05	1
GenBank AQ157198 AQ157198 nbxb0009G17r CUGI Rice BAC Lib...	322	1.3e-05	1
GenBank AQ289130 AQ289130 nbxb0034B15f CUGI Rice BAC Lib...	318	1.6e-05	1
GenBank ATAC007045 AC007045 Arabidopsis thaliana chromosom...	331	1.9e-05	1
GenBank AQ291567 AQ291567 nbxb0039K17r CUGI Rice BAC Lib...	310	2.0e-05	1
GenBank AQ049928 AQ049928 nbxb0003aB10f CUGI Rice BAC Li...	317	2.1e-05	1
GenBank AQ160981 AQ160981 nbxb0006E06r CUGI Rice BAC Lib...	309	2.2e-05	1

GenBank AQ446132 AQ446132	nxbx0058K16f	CUGI Rice BAC Lib...	306	3.6e-05	1
GenBank AB005247 AB005247	Arabidopsis thaliana genomic D...		324	4.0e-05	1
GenBank AQ291753 AQ291753	nxbx0039J18r	CUGI Rice BAC Lib...	308	5.2e-05	1
GenBank AQ259556 AQ259556	nxbx0023E16f	CUGI Rice BAC Lib...	301	6.6e-05	1
GenBank AQ157366 AQ157366	nxbx0009I04r	CUGI Rice BAC Lib...	302	8.7e-05	1
GenBank AQ051052 AQ051052	nxbx0004dH10f	CUGI Rice BAC Li...	307	9.3e-05	1
GenBank AQ290151 AQ290151	nxbx0036M02r	CUGI Rice BAC Lib...	296	0.00014	1
GenBank AQ156460 AQ156460	nxbx0007L24f	CUGI Rice BAC Lib...	279	0.00028	1
GenBank AQ364836 AQ364836	nxbx0061N13r	CUGI Rice BAC Lib...	295	0.00030	1
GenBank AQ257364 AQ257364	nxbx0018K05f	CUGI Rice BAC Lib...	288	0.00054	1
GenBank AQ272568 AQ272568	nxbx0028M15r	CUGI Rice BAC Lib...	285	0.00061	1
GenBank IG014G16 AF147260	Arabidopsis thaliana BAC IG014...		292	0.0012	1
GenBank AQ363747 AQ363747	nxbx0059J08f	CUGI Rice BAC Lib...	280	0.0015	1
GenBank AQ258168 AQ258168	nxbx0019F14r	CUGI Rice BAC Lib...	276	0.0016	1
GenBank AQ367541 AQ367541	toxb0002J15r	CUGI Tomato BAC L...	272	0.0020	1
GenBank AQ510607 AQ510607	nxbx0095P13r	CUGI Rice BAC Lib...	274	0.0020	1
GenBank AQ163492 AQ163492	nxbx0007I13r	CUGI Rice BAC Lib...	271	0.0047	1
GenBank AB005248 AB005248	Arabidopsis thaliana genomic D...		276	0.0063	1
GenBank AQ157625 AQ157625	nxbx0009F14r	CUGI Rice BAC Lib...	260	0.0091	1
GenBank AQ287862 AQ287862	nxbx0031B21f	CUGI Rice BAC Lib...	260	0.011	1
GenBank AQ161037 AQ161037	nxbx0006K02r	CUGI Rice BAC Lib...	256	0.020	1
GenBank AQ289339 AQ289339	nxbx0034L16r	CUGI Rice BAC Lib...	253	0.025	1
GenBank AQ509608 AQ509608	nxbx0096L19f	CUGI Rice BAC Lib...	248	0.030	1
GenBank AQ290964 AQ290964	nxbx0037P20r	CUGI Rice BAC Lib...	250	0.044	1
GenBank AQ363224 AQ363224	nxbx0055I24f	CUGI Rice BAC Lib...	244	0.045	1
GenBank AQ260075 AQ260075	nxbx0011J17f	CUGI Rice BAC Lib...	245	0.047	1
GenBank AQ159353 AQ159353	nxbx0013P23r	CUGI Rice BAC Lib...	244	0.051	1
GenBank AQ257831 AQ257831	nxbx0019E15r	CUGI Rice BAC Lib...	237	0.17	1
GenBank AQ290582 AQ290582	nxbx0037G16f	CUGI Rice BAC Lib...	230	0.27	1
GenBank AQ288161 AQ288161	nxbx0032D21r	CUGI Rice BAC Lib...	222	0.54	1
GenBank AQ050782 AQ050782	nxbx0001cC06r	CUGI Rice BAC Li...	220	0.61	1
GenBank AQ291304 AQ291304	nxbx0038F02r	CUGI Rice BAC Lib...	217	0.78	1
GenBank AQ250299 AQ250299	T5A8-Sp6	TAMU Arabidopsis thal...	213	0.86	1
GenBank B78055 B78055	T30C12TR	TAMU Arabidopsis thalia...	207	0.96	1
GenBank AQ248560 AQ248560	T10B22-Sp6	TAMU Arabidopsis th...	176	0.98	1
GenBank B29292 B29292	T31A12TV	TAMU Arabidopsis thalia...	202	0.994	1
GenBank AQ288882 AQ288882	nxbx0018N15f	CUGI Rice BAC Lib...	204	0.999	1
GenBank B77753 B77753	T28O18TR	TAMU Arabidopsis thalia...	197	0.9994	1

Homologien zu Y67G1L:

Query Sequence: 67g1lt_c.seq gegen PlantDNA (Length: 1731)

Database: PlantDNA 309,159 sequences; 266,318,736 total letters.

		High	Smallest	
		Score	Sum	
Sequences producing High-scoring Segment Pairs:		Score	P(N)	N
F9L1	AC007591 Arabidopsis thaliana chromosome 1 BAC...	262	0.027	1
AB026636	AB026636 Arabidopsis thaliana genomic DNA, chr...	253	0.069	1
CNS00SMS	AL088594 Arabidopsis thaliana genome survey se...	181	0.37	1
ATAC004684	AC004684 Arabidopsis thaliana chromosome II BA...	235	0.38	1
AC007505	AC007505 Arabidopsis thaliana chromosome I clo...	228	0.63	1
ATT23J7	AL049746 Arabidopsis thaliana DNA chromosome 3...	225	0.74	1
ATHACC2	D34632 Arabidopsis thaliana acc2 gene for acet...	218	0.92	1
STPPGT4	X60397 S.tuberosum promoter region and partial...	207	0.9991	1
AQ576077	AQ576077 nbxb0088F17r CUGI Rice BAC Library Or...	200	0.9999	1

Homologien zu Y67G1R:

Query Sequence: 67g1r_co.seq gegen pdb (Length: 647)

Database: PlantDNA 185,527 sequences; 168,664,634 total letters.

		High	Smallest	
		Score	Sum	
Sequences producing High-scoring Segment Pairs:		Score	P(N)	N
GenBank B19463 B19463	F24E21-T7 IGF Arabidopsis thalia...	285	4.8e-07	1
GenBank AQ250241 AQ250241	T3D10-Sp6 TAMU Arabidopsis tha...	280	8.6e-07	1
GenBank AB016873 AB016873	Arabidopsis thaliana genomic D...	324	1.9e-06	1
GenBank AC006068 AC006068	*** SEQUENCING IN PROGRESS ***...	302	2.7e-05	1
GenBank AQ051567 AQ051567	nbxb0002cA02r CUGI Rice BAC Li...	285	3.3e-05	1
GenBank ATAC005970 AC005970	Arabidopsis thaliana chromosom...	300	3.5e-05	1
GenBank ATZ83321 Z83321	A.thaliana 16 kb chromosome 1 DN...	297	4.8e-05	1
GenBank AQ050079 AQ050079	nbxb0003bC02r CUGI Rice BAC Li...	287	5.3e-05	1
GenBank AQ272072 AQ272072	nbxb0027E12r CUGI Rice BAC Lib...	286	5.5e-05	1
GenBank CHMPXX X04465	Liverwort Marchantia polymorpha ...	294	7.0e-05	1
GenBank AB009048 AB009048	Arabidopsis thaliana genomic D...	292	8.8e-05	1
GenBank ATF24J7 AL021768	Arabidopsis thaliana DNA chrom...	292	8.8e-05	1
GenBank AC003970 AC003970	Arabidopsis thaliana chromosom...	290	0.00011	1

GenBank ATAC003040 AC003040 Arabidopsis thaliana chromosom...	290	0.00011	1
GenBank AB005238 AB005238 Arabidopsis thaliana genomic D...	289	0.00013	1
GenBank AB016872 AB016872 Arabidopsis thaliana genomic D...	287	0.00016	1
GenBank AB015476 AB015476 Arabidopsis thaliana genomic D...	285	0.00020	1
GenBank T24M8 AF077409 Arabidopsis thaliana BAC T24M8...	280	0.00035	1
GenBank AC002983 AC002983 A. thaliana BAC T3F12 from chr...	280	0.00035	1
GenBank AC005489 AC005489 Genomic sequence for Arabidops...	279	0.00040	1
GenBank AC005825 AC005825 *** SEQUENCING IN PROGRESS ***...	277	0.00050	1
GenBank T12H20 AF080119 Arabidopsis thaliana BAC T12H2...	276	0.00056	1
GenBank AF031433 AF031433 Gossypium arboreum tRNA-Thr (t...	272	0.00058	1
GenBank PSPHY X14077 Pea phy gene for phytochrome apo...	274	0.00066	1
GenBank AB020752 AB020752 *** SEQUENCING IN PROGRESS ***...	274	0.00070	1
GenBank AC006218 AC006218 *** SEQUENCING IN PROGRESS ***...	272	0.00088	1
GenBank ATAC004411 AC004411 Arabidopsis thaliana chromosom...	268	0.0010	1
GenBank AF058914 AF058914 Arabidopsis thaliana BAC F21E1...	270	0.0011	1
GenBank AC005882 AC005882 Arabidopsis thaliana chromosom...	267	0.0016	1
GenBank ATAC005819 AC005819 Arabidopsis thaliana chromosom...	266	0.0017	1
GenBank AQ050147 AQ050147 nbxb0003bG11f CUGI Rice BAC Li...	258	0.0018	1
GenBank CUSSEQ M84214 Cucumis sativus ORF 1, chitinase...	265	0.0019	1
GenBank AB022216 AB022216 Arabidopsis thaliana genomic D...	265	0.0020	1
GenBank IG002P16 AF007270 Arabidopsis thaliana BAC IG002...	264	0.0022	1
GenBank ATAP21 Z99707 Arabidopsis thaliana DNA chromos...	263	0.0025	1
GenBank B08617 B08617 F4A18-T7 IGF Arabidopsis thalian...	257	0.0026	1
GenBank AB011476 AB011476 Arabidopsis thaliana genomic D...	262	0.0027	1
GenBank AB011482 AB011482 Arabidopsis thaliana genomic D...	261	0.0031	1
GenBank ATAC005396 AC005396 Arabidopsis thaliana chromosom...	261	0.0031	1
GenBank AMTAP1G X57295 A. majus tap1 gene for TAP1. 7/91	260	0.0032	1
GenBank LEU72148 U72148 Lycopersicon esculentum plasma m...	260	0.0032	1
GenBank AC006216 AC006216 *** SEQUENCING IN PROGRESS ***...	258	0.0043	1
GenBank F19P19 AC000104 Sequence of BAC F19P19 from Ar...	255	0.0046	1
GenBank AF050665 AF050665 Spirogyra maxima tRNA-Ile gene...	257	0.0046	1
GenBank ATAF000657 AF000657 Arabidopsis thaliana BAC F19G1...	257	0.0048	1
GenBank AC005142 AC005142 Arabidopsis thaliana chromosom...	256	0.0054	1
GenBank STU24087 U24087 Solanum tuberosum sucrose syntha...	253	0.0055	1
GenBank ATT16H5 AL024486 Arabidopsis thaliana DNA chrom...	254	0.0067	1
GenBank ATAC005315 AC005315 Arabidopsis thaliana chromosom...	253	0.0076	1
GenBank AQ330023 AQ330023 nbxb0046K21r CUGI Rice BAC Lib...	246	0.0078	1
GenBank AB015474 AB015474 Arabidopsis thaliana genomic D...	250	0.0081	1
GenBank AC005687 AC005687 Arabidopsis thaliana BAC F1I21...	250	0.0081	1
GenBank ATAC003105 AC003105 Arabidopsis thaliana chromosom...	252	0.0085	1
GenBank AC000348 AC000348 Genomic sequence for Arabidops...	252	0.0085	1
GenBank ATAC004705 AC004705 Arabidopsis thaliana chromosom...	251	0.0094	1
GenBank ATAC005398 AC005398 Arabidopsis thaliana chromosom...	251	0.0094	1

GenBank BNDNAM X67838 B.napus DNA for myrosinase. 11/96	249	0.011	1
GenBank B23721 B23721 F16L18TR IGF Arabidopsis thalian...	241	0.011	1
GenBank AB019231 AB019231 *** SEQUENCING IN PROGRESS ***...	249	0.012	1
GenBank B22209 B22209 F17M1TR IGF Arabidopsis thaliana...	195	0.013	1
GenBank AF072897 AF072897 Arabidopsis thaliana BAC T8A17...	248	0.013	1
GenBank AB017069 AB017069 Arabidopsis thaliana genomic D...	248	0.013	1
GenBank ATAC002510 AC002510 Arabidopsis thaliana chromosom...	247	0.015	1
GenBank AF015787 AF015787 Malus domestica 1-aminocyclopr...	246	0.015	1
GenBank AQ163646 AQ163646 nbxb0007B21r CUGI Rice BAC Lib...	235	0.016	1
GenBank AC006081 AC006081 *** SEQUENCING IN PROGRESS ***...	246	0.016	1
GenBank ATU83501 U83501 Arabidopsis thaliana permease ho...	244	0.018	1
GenBank AB011485 AB011485 Arabidopsis thaliana genomic D...	245	0.018	1
GenBank AB018114 AB018114 *** SEQUENCING IN PROGRESS ***...	244	0.021	1
GenBank AF058825 AF058825 Arabidopsis thaliana BAC F7N22...	244	0.021	1
GenBank AQ050020 AQ050020 nbxb0003aG12f CUGI Rice BAC Li...	235	0.024	1
GenBank ATAC005312 AC005312 Arabidopsis thaliana chromosom...	242	0.026	1
GenBank AC004146 AC004146 Arabidopsis thaliana chromosom...	238	0.031	1
GenBank AB010694 AB010694 Arabidopsis thaliana genomic D...	240	0.032	1
GenBank AC006413 AC006413 *** SEQUENCING IN PROGRESS ***...	240	0.032	1
GenBank MPOCPUP D00379 Marchantia polymorpha (liverwort...	236	0.032	1
GenBank ATF18F4 AL021637 Arabidopsis thaliana DNA chrom...	237	0.035	1
GenBank AQ050318 AQ050318 nbxb0003dC05r CUGI Rice BAC Li...	233	0.036	1
GenBank ATAC002505 AC002505 Arabidopsis thaliana chromosom...	239	0.036	1
GenBank AQ011156 AQ011156 F21D21TFD IGF Arabidopsis thal...	214	0.039	1
GenBank AC002130 AC002130 The sequence of BAC F1N21 from...	238	0.040	1
GenBank AF044603 AF044603 Zea mays cytokinin oxidase (ck...	235	0.041	1
GenBank AC005292 AC005292 *** SEQUENCING IN PROGRESS ***...	235	0.044	1
GenBank AC006085 AC006085 *** SEQUENCING IN PROGRESS ***...	235	0.044	1
GenBank AB005236 AB005236 Arabidopsis thaliana genomic D...	237	0.044	1
GenBank ATAC004165 AC004165 Arabidopsis thaliana chromosom...	237	0.044	1
GenBank AQ330185 AQ330185 nbxb0046N05f CUGI Rice BAC Lib...	228	0.047	1
GenBank AQ287246 AQ287246 nbxb0027K06f CUGI Rice BAC Lib...	230	0.048	1
GenBank AQ050145 AQ050145 nbxb0003bG08f CUGI Rice BAC Li...	229	0.054	1
GenBank T14P8 AF069298 Arabidopsis thaliana BAC T14P8...	235	0.055	1
GenBank ATAC004136 AC004136 Arabidopsis thaliana chromosom...	235	0.055	1
GenBank ATM4E13 AL022023 Arabidopsis thaliana DNA chrom...	234	0.061	1
GenBank POPHOMT1A D49710 Populus kitakamiensis (P. siebol...	233	0.063	1
GenBank B10732 B10732 T6M18-T7 TAMU Arabidopsis thalia...	228	0.065	1
GenBank AB005248 AB005248 *** SEQUENCING IN PROGRESS ***...	232	0.076	1
GenBank AC006268 AC006268 Arabidopsis thaliana BAC T24G2...	232	0.076	1
GenBank AB006793 AB006793 Ipomoea nil DNA for dihydrofla...	231	0.083	1
GenBank AF069716 AF069716 Arabidopsis Thaliana BAC F6A4,...	231	0.085	1
GenBank AC004793 AC004793 *** SEQUENCING IN PROGRESS ***...	229	0.085	1

GenBank|ATF13D4|AL031369 Arabidopsis thaliana DNA, BAC ... 229 0.085 1

Warning: Descriptions of 229 database sequences were not reported due to the limiting value of parameter V = 100.

Homologien zu Y73G8L:

Query Sequence: 73g81_co.seq gegen pdb (Length: 1462)

Database: PlantDNA 185,711 sequences; 169,634,083 total letters.

		Smallest		
		Sum		
		High	Probability	
Sequences producing High-scoring Segment Pairs:		Score	P(N)	N
GenBank AC005956 AC005956 *** SEQUENCING IN PROGRESS *** A...	246	0.076		1
GenBank AB015470 AB015470 Arabidopsis thaliana genomic DNA...	221	0.66		1
GenBank AB001684 AB001684 Chlorella vulgaris C-27 chloropl...	212	0.94		1

Homologien zu Y73G8R:

Query Sequence: 73g8rco.seq gegen pdb (Length: 1206)

Database: PlantDNA 185,527 sequences; 168,664,634 total letters.

		Smallest		
		Sum		
		High	Probability	
Sequences producing High-scoring Segment Pairs:		Score	P(N)	N
GenBank NATPINTR Z35426 Nicotiana alata retrotransposon ...	988	1.9e-39		1
GenBank NATPINTD Z35427 N.alata DNA for retrotransposon ...	982	2.3e-39		1
GenBank LHDEL X13886 Lilium henryi del transposon. 3/91	894	3.5e-34		1
GenBank AQ257034 AQ257034 nbxb0017I18f CUGI Rice BAC Lib...	798	9.5e-31		1
GenBank AF050455 AF050455 Zea mays gypsy/Ty3-type retrot...	787	2.6e-29		1
GenBank AQ160808 AQ160808 nbxb0006C15r CUGI Rice BAC Lib...	734	6.3e-28		1
GenBank AQ257961 AQ257961 nbxb0019B17f CUGI Rice BAC Lib...	695	3.5e-26		1
GenBank AQ159351 AQ159351 nbxb0013P19r CUGI Rice BAC Lib...	633	2.9e-23		1
GenBank AQ156036 AQ156036 nbxb0002I11f CUGI Rice BAC Lib...	628	4.0e-23		1
GenBank AQ289291 AQ289291 nbxb0034F12r CUGI Rice BAC Lib...	622	9.1e-23		1
GenBank AQ288786 AQ288786 nbxb0033H15r CUGI Rice BAC Lib...	561	1.3e-19		1
GenBank AQ325683 AQ325683 nbxb0018N07r CUGI Rice BAC Lib...	554	2.4e-19		1
GenBank AQ327484 AQ327484 nbxb0041K17r CUGI Rice BAC Lib...	522	8.1e-18		1

GenBank AB018121 AB018121 *** SEQUENCING IN PROGRESS ***...	570	3.0e-17	1
GenBank AC006228 AC006228 *** SEQUENCING IN PROGRESS ***...	552	2.3e-16	1
GenBank F3H7 AF118222 Arabidopsis thaliana BAC F3H7....	552	2.3e-16	1
GenBank AQ258500 AQ258500 nbxb0020B08f CUGI Rice BAC Lib...	487	4.8e-16	1
GenBank AQ273396 AQ273396 nbxb0030E05r CUGI Rice BAC Lib...	487	5.1e-16	1
GenBank AB011478 AB011478 Arabidopsis thaliana genomic D...	541	7.9e-16	1
GenBank ATAC005398 AC005398 Arabidopsis thaliana chromosom...	516	1.3e-14	1
GenBank AQ157606 AQ157606 nbxb0009D16r CUGI Rice BAC Lib...	452	2.5e-14	1
GenBank AQ272819 AQ272819 nbxb0028B12f CUGI Rice BAC Lib...	454	2.9e-14	1
GenBank AF058825 AF058825 Arabidopsis thaliana BAC F7N22...	504	4.9e-14	1
GenBank AC002534 AC002534 Arabidopsis thaliana BAC T32N1...	503	5.4e-14	1
GenBank AC005965 AC005965 Arabidopsis thaliana BAC T19G1...	500	7.6e-14	1
GenBank AC006218 AC006218 *** SEQUENCING IN PROGRESS ***...	500	7.6e-14	1
GenBank F9D12 AF077407 Arabidopsis thaliana BAC F9D12...	500	7.6e-14	1
GenBank AQ291104 AQ291104 nbxb0038E10r CUGI Rice BAC Lib...	440	8.0e-14	1
GenBank AQ157943 AQ157943 nbxb0010K02f CUGI Rice BAC Lib...	442	8.4e-14	1
GenBank AQ330681 AQ330681 nbxb0047B12r CUGI Rice BAC Lib...	433	1.6e-13	1
GenBank AQ256237 AQ256237 nbxb0015L16r CUGI Rice BAC Lib...	425	4.5e-13	1
GenBank AQ258644 AQ258644 nbxb0020P14f CUGI Rice BAC Lib...	407	2.8e-12	1
GenBank AQ288892 AQ288892 nbxb0018P15f CUGI Rice BAC Lib...	434	3.3e-12	1
GenBank AC006267 AC006267 Arabidopsis thaliana chromosom...	439	5.9e-11	1
GenBank AQ163648 AQ163648 nbxb0007B23r CUGI Rice BAC Lib...	380	6.1e-11	1
GenBank AQ159111 AQ159111 nbxb0013A13r CUGI Rice BAC Lib...	353	4.0e-08	1
GenBank AQ290084 AQ290084 nbxb0036E10f CUGI Rice BAC Lib...	358	5.6e-08	1
GenBank AQ288260 AQ288260 nbxb0032D04r CUGI Rice BAC Lib...	350	1.9e-07	1
GenBank BVPDRV2RP Z69352 B.vulgaris repetitive DNA (clone...	275	6.0e-06	1
GenBank AQ257300 AQ257300 nbxb0018E03r CUGI Rice BAC Lib...	311	1.4e-05	1
GenBank AQ258796 AQ258796 nbxb0021G06r CUGI Rice BAC Lib...	301	6.7e-05	1
GenBank AQ051665 AQ051665 nbxb0002cF01f CUGI Rice BAC Li...	263	0.0035	1
GenBank B22728 B22728 F21J8TR IGF Arabidopsis thaliana...	217	0.0036	1
GenBank B29332 B29332 T31N13TV TAMU Arabidopsis thalia...	247	0.018	1
GenBank AQ258585 AQ258585 nbxb0020J14r CUGI Rice BAC Lib...	246	0.022	1
GenBank AQ289949 AQ289949 nbxb0036G19f CUGI Rice BAC Lib...	233	0.081	1
GenBank BPPDRV1RP Z69351 B.vulgaris repetitive DNA (clone...	217	0.11	1
GenBank AB015478 AB015478 Arabidopsis thaliana genomic D...	232	0.22	1
GenBank CHMPXX X04465 Liverwort Marchantia polymorpha ...	230	0.27	1
GenBank AQ271568 AQ271568 nbxb0026A02r CUGI Rice BAC Lib...	220	0.36	1
GenBank B61723 B61723 T18M11TR TAMU Arabidopsis thalia...	211	0.55	1
GenBank AQ251090 AQ251090 F18N1-Sp6 IGF Arabidopsis thal...	164	0.72	1
GenBank F5I14 AC001229 Sequence of BAC F5I14 from Ara...	214	0.82	1
GenBank ATAP21 Z99707 Arabidopsis thaliana DNA chromos...	212	0.88	1
GenBank AQ273448 AQ273448 nbxb0030I13r CUGI Rice BAC Lib...	203	0.89	1
GenBank LESODCC X87372 L.esculentum SodCc;Le;2 gene. 9/96	210	0.92	1

GenBank AB009054 AB009054 Arabidopsis thaliana genomic D...	210	0.93	1
GenBank ATAC004705 AC004705 Arabidopsis thaliana chromosom...	210	0.93	1
GenBank AB006696 AB006696 Arabidopsis thaliana genomic D...	206	0.98	1
GenBank B12806 B12806 T10F15-Sp6 TAMU Arabidopsis thal...	199	0.998	1
GenBank ATAC002392 AC002392 Arabidopsis thaliana chromosom...	201	0.999	1
GenBank AQ273416 AQ273416 nbxb0030G03f CUGI Rice BAC Lib...	192	0.9994	1
GenBank BVPDRV3RP Z69353 B.vulgaris repetitive DNA (clone...	150	0.99991	1
GenBank ATU93215 U93215 Arabidopsis thaliana chromosome ...	198	0.99991	1
GenBank EPFCPCG M81884 Epifagus virginiana chloroplast ...	198	0.99992	1
GenBank AQ158704 AQ158704 nbxb0012A23r CUGI Rice BAC Lib...	192	0.99995	1

Homologien zu Y81D10L:

Query Sequence: 81d10l_c.seq gegen PlantDNA (Length: 1019)

Database: PlantDNA 311,147 sequences; 268,498,862 total letters.

Sequences producing High-scoring Segment Pairs:	High Score	Smallest Sum	
		Probability P(N)	N
GB:AQ161070 AQ161070 nbxb0006002f CUGI Rice BAC Library O...	305	2.1e-05	1
GB:B20014 B20014 F9J1-T7 IGF Arabidopsis thaliana genom...	302	6.1e-05	1
GB:B09570 B09570 F20M14-T7 IGF Arabidopsis thaliana gen...	291	0.00029	1
GB:AQ509311 AQ509311 nbxb0094E06r CUGI Rice BAC Library O...	266	0.0021	1
GB:ATF7K2 AL033545 Arabidopsis thaliana DNA chromosome ...	264	0.010	1
GB:AQ326508 AQ326508 nbxb0036D04f CUGI Rice BAC Library O...	215	0.65	1
GB:AQ363076 AQ363076 nbxb0053L15f CUGI Rice BAC Library O...	213	0.72	1
GB:B19990 B19990 F19D22-T7 IGF Arabidopsis thaliana gen...	211	0.80	1
GB:B73761 B73761 T26C6TF TAMU Arabidopsis thaliana geno...	192	0.94	1
GB:Z33843 Z33843 ATTS2942 Grenoble-B Arabidopsis thalia...	159	0.95	1
GB:AQ248728 AQ248728 T13J24-Sp6 TAMU Arabidopsis thaliana...	159	0.98	1
GB:B19199 B19199 F6F11-T7 IGF Arabidopsis thaliana geno...	201	0.996	1
GB:B19183 B19183 F2I13-T7 IGF Arabidopsis thaliana geno...	197	0.9998	1
GB:B20835 B20835 T28H19-T7 TAMU Arabidopsis thaliana ge...	195	0.9999	1

Homologien zu Y81D10R:

Query Sequence: 81R1_2_c.seq gegen PlantDNA (Length: 1705)

Database: PlantDNA 311,147 sequences; 268,498,862 total letters.

Sequences producing High-scoring Segment Pairs:		High Score	Smallest Sum Probability P(N)	N
GB:N95850	N95850 21992 Lambda-PRL1 Arabidopsis thalia...	269	0.00011	1
GB:AB024025	AB024025 Arabidopsis thaliana genomic DNA, ...	264	0.022	1
GB:AB008264	AB008264 Arabidopsis thaliana genomic DNA, ...	250	0.093	1
GB:AC006266	AC006266 Arabidopsis thaliana BAC F1K3 from...	246	0.14	1
GB:ATF16J13	AL049638 Arabidopsis thaliana DNA chromosom...	241	0.22	1
GB:D88193	D88193 Brassica rapa DNA for S-receptor kin...	199	0.26	2
GB:AB011483	AB011483 Arabidopsis thaliana genomic DNA, ...	239	0.27	1
GB:ATAC007171	AC007171 Arabidopsis thaliana chromosome II...	234	0.41	1
GB:AB012241	AB012241 Arabidopsis thaliana genomic DNA, ...	234	0.41	1
GB:T1N24	AF149413 Arabidopsis thaliana BAC T1N24. 6/...	230	0.56	1
GB:T1N24	AF149413 Arabidopsis thaliana BAC T1N24. 5/99	230	0.56	1
GB:AA749495	AA749495 L30-36T3 Ice plant Lambda Uni-Zap ...	177	0.56	1
GB:ATAC006446	AC006446 Arabidopsis thaliana chromosome II...	195	0.59	2
GB:ATAC005396	AC005396 Arabidopsis thaliana chromosome II...	229	0.59	1
GB:AC005964	AC005964 Arabidopsis thaliana chromosome V ...	228	0.63	1
GB:B28008	B28008 T25H7TRB TAMU Arabidopsis thaliana g...	219	0.66	1
GB:AC006917	AC006917 Genomic sequence for Arabidopsis t...	227	0.67	1
GB:AC007123	AC007123 Arabidopsis thaliana BAC F21A20 fr...	225	0.75	1
GB:AF069441	AF069441 Arabidopsis thaliana BAC T19B17 fr...	224	0.78	1
GB:AB011475	AB011475 Arabidopsis thaliana genomic DNA, ...	223	0.81	1
GB:AB025617	AB025617 Arabidopsis thaliana genomic DNA, ...	222	0.84	1
GB:AC007767	AC007767 Arabidopsis thaliana chromosome 1 ...	222	0.85	1
GB:AI736078	AI736078 sb22e08.y1 Gm-c1007 Glycine max cD...	168	0.90	1
GB:ATAC005169	AC005169 Arabidopsis thaliana chromosome II...	220	0.90	1
GB:MSA237728	AJ237728 Medicago sativa DNA for putative m...	214	0.91	1
GB:ATAC004077	AC004077 Arabidopsis thaliana chromosome II...	219	0.92	1
GB:B09448	B09448 T2203-Sp6.1 TAMU Arabidopsis thalian...	214	0.96	1
GB:PWU02970	U02970 Prototheca wickerhamii 263-11 comple...	216	0.97	1
GB:ATAC004138	AC004138 Arabidopsis thaliana chromosome II...	216	0.97	1
GB:AF044032	AF044032 Arabidopsis thaliana glutathione S...	214	0.98	1
GB:ATM12G13	AL049916 Arabidopsis thaliana clone ATM12G1...	215	0.98	1
GB:ATT12G13	AL080252 Arabidopsis thaliana DNA chromosom...	215	0.98	1
GB:A43607	A43607 Sequence 32 from Patent WO9507357. 3/97	213	0.98	1
GB:A43738	A43738 Sequence 4 from Patent WO9506740. 3/97	213	0.99	1

GB:AI748712	AI748712 sb61a01.y1 Gm-c1010 Glycine max cD...	164	0.990	1
GB:B25065	B25065 F24I13TR IGF Arabidopsis thaliana ge...	159	0.997	1
GB:AC007203	AC007203 Arabidopsis thaliana chromosome I ...	211	0.998	1
GB:CHMPXX	X04465 Liverwort Marchantia polymorpha chlo...	211	0.998	1
GB:ATAC004005	AC004005 Arabidopsis thaliana chromosome II...	210	0.999	1
GB:AQ051567	AQ051567 nbxb0002cA02r CUGI Rice BAC Librar...	201	0.9992	1
GB:AC005275	AC005275 Arabidopsis thaliana BAC F4C21 fro...	209	0.9994	1
GB:ATAC006929	AC006929 Arabidopsis thaliana chromosome II...	209	0.9994	1
GB:ATFCA4	Z97339 Arabidopsis thaliana DNA chromosome ...	208	0.9997	1
GB:ATFCA4	Z97339 Arabidopsis thaliana DNA chromosome ...	208	0.9997	1
GB:ATFCA5	Z97340 Arabidopsis thaliana DNA chromosome ...	208	0.9997	1
GB:ATFCA5	Z97340 Arabidopsis thaliana DNA chromosome ...	208	0.9997	1
GB:AB009049	AB009049 Arabidopsis thaliana genomic DNA, ...	207	0.9999	1

Homologien zu Y85A6L:

Query Sequence: 85A6L_co.seq gegen PlantDNA (Length: 682)

Database: PlantDNA 212,553 sequences; 189,342,484 total letters.

		High	Smallest Sum Probability	
Sequences producing High-scoring Segment Pairs:		Score	P(N)	N
GenBank T15F16 AF076275 Arabidopsis thaliana BAC T15F...	306	2.6e-05	1	
GenBank AC007070 AC007070 Arabidopsis thaliana 'TAMU' B...	293	0.00012	1	
GenBank AB015472 AB015472 Arabidopsis thaliana genomic ...	281	0.00045	1	
GenBank AB006707 AB006707 Arabidopsis thaliana genomic ...	280	0.00050	1	
GenBank D88193 D88193 Brassica rapa DNA for S-recepto...	273	0.0011	1	
GenBank NTA6235 AJ006235 Nicotiana tabacum DNA fragmen...	272	0.0011	1	
GenBank ATAC003028 AC003028 Arabidopsis thaliana chromoso...	271	0.0014	1	
GenBank AB007650 AB007650 Arabidopsis thaliana genomic ...	268	0.0019	1	
GenBank ATF13D4 AL031369 Arabidopsis thaliana DNA chro...	268	0.0019	1	
GenBank AF058825 AF058825 Arabidopsis thaliana BAC F7N2...	266	0.0024	1	
GenBank AB016888 AB016888 Arabidopsis thaliana genomic ...	257	0.0066	1	
GenBank AI055732 AI055732 coau0004P04 Cotton Boll Absci...	245	0.0096	1	
GenBank AQ250491 AQ250491 T7L17-T7 TAMU Arabidopsis tha...	243	0.010	1	
GenBank AQ050147 AQ050147 nbxb0003bG11f CUGI Rice BAC L...	241	0.018	1	
GenBank AB007647 AB007647 Arabidopsis thaliana genomic ...	247	0.020	1	
GenBank ATAC002521 AC002521 Arabidopsis thaliana chromoso...	247	0.020	1	
GenBank LPJ002236 AJ002236 Lycopersicon pimpinellifolium...	245	0.025	1	
GenBank ATAC005727 AC005727 Arabidopsis thaliana chromoso...	242	0.034	1	
GenBank AC006955 AC006955 *** SEQUENCING IN PROGRESS **...	240	0.043	1	

GenBank AC006067 AC006067 *** SEQUENCING IN PROGRESS **...	239	0.048	1
GenBank COTLEA14A M88321 <i>Gossypium hirsutum</i> group 4 late...	238	0.049	1
GenBank AB012243 AB012243 <i>Arabidopsis thaliana</i> genomic ...	238	0.053	1
GenBank AC006266 AC006266 <i>Arabidopsis thaliana</i> BAC F1K3...	237	0.059	1
GenBank AQ258984 AQ258984 nbxb0021P09r CUGI Rice BAC Li...	231	0.062	1
GenBank AB011476 AB011476 <i>Arabidopsis thaliana</i> genomic ...	236	0.066	1
GenBank CHMPXX X04465 Liverwort <i>Marchantia polymorpha</i> ...	236	0.066	1
GenBank AB011478 AB011478 <i>Arabidopsis thaliana</i> genomic ...	235	0.073	1
GenBank AC005508 AC005508 <i>Arabidopsis thaliana</i> chromoso...	235	0.073	1
GenBank AC006200 AC006200 *** SEQUENCING IN PROGRESS **...	235	0.073	1
GenBank AF058826 AF058826 <i>Arabidopsis thaliana</i> BAC T26D...	235	0.073	1
GenBank AQ329745 AQ329745 nbxb0045N05r CUGI Rice BAC Li...	228	0.089	1
GenBank AB011477 AB011477 <i>Arabidopsis thaliana</i> genomic ...	233	0.090	1
GenBank AQ325426 AQ325426 nbxb0012P02f CUGI Rice BAC Li...	225	0.10	1
GenBank AQ259915 AQ259915 nbxb0024P17f CUGI Rice BAC Li...	223	0.12	1
GenBank B78506 B78506 T30N13TFC TAMU <i>Arabidopsis thal</i> ...	221	0.13	1
GenBank AQ050410 AQ050410 nbxb0004aA04f CUGI Rice BAC L...	223	0.14	1
GenBank AQ366206 AQ366206 nbxb0065M22r CUGI Rice BAC Li...	219	0.18	1
GenBank ATF6I18 AL022198 <i>Arabidopsis thaliana</i> DNA chro...	226	0.19	1
GenBank ATT6K21 AL021889 <i>Arabidopsis thaliana</i> DNA chro...	225	0.20	1
GenBank ATFCA1 Z97336 <i>Arabidopsis thaliana</i> DNA chromo...	225	0.20	1
GenBank AB018114 AB018114 <i>Arabidopsis thaliana</i> genomic ...	224	0.22	1
GenBank ATAC003000 AC003000 <i>Arabidopsis thaliana</i> chromoso...	224	0.22	1
GenBank AB016875 AB016875 <i>Arabidopsis thaliana</i> genomic ...	223	0.25	1
GenBank AC002534 AC002534 <i>Arabidopsis thaliana</i> BAC T32N...	223	0.25	1
GenBank ATAC005170 AC005170 <i>Arabidopsis thaliana</i> chromoso...	223	0.25	1
GenBank AB018107 AB018107 <i>Arabidopsis thaliana</i> genomic ...	222	0.27	1
GenBank ATAC007019 AC007019 <i>Arabidopsis thaliana</i> chromoso...	222	0.27	1
GenBank ATAC005851 AC005851 <i>Arabidopsis thaliana</i> chromoso...	221	0.30	1
GenBank AC006929 AC006929 *** SEQUENCING IN PROGRESS **...	221	0.30	1
GenBank B11728 B11728 T8D18-Sp6.1 TAMU <i>Arabidopsis th</i> ...	214	0.34	1
GenBank AQ251310 AQ251310 T31G13-Sp6 TAMU <i>Arabidopsis t</i> ...	212	0.34	1
GenBank AQ251294 AQ251294 T30G21-Sp6 TAMU <i>Arabidopsis t</i> ...	168	0.35	1
GenBank ATAC005169 AC005169 <i>Arabidopsis thaliana</i> chromoso...	218	0.39	1
GenBank AB020752 AB020752 <i>Arabidopsis thaliana</i> genomic ...	217	0.42	1
GenBank TOMARPI L25128 <i>Lycopersicon esculentum</i> auxin-i...	215	0.47	1
GenBank AQ362453 AQ362453 nbxb0049N14f CUGI Rice BAC Li...	210	0.48	1
GenBank AI054755 AI054755 coau0001P15 Cotton Boll Absci...	209	0.51	1
GenBank ATAC003105 AC003105 <i>Arabidopsis thaliana</i> chromoso...	214	0.53	1
GenBank ATAP21 Z99707 <i>Arabidopsis thaliana</i> DNA chromo...	214	0.54	1
GenBank AQ329593 AQ329593 nbxb0045G18r CUGI Rice BAC Li...	207	0.56	1
GenBank AQ368006 AQ368006 toxb0001L11r CUGI Tomato BAC ...	206	0.56	1
GenBank T9A4 AF096373 <i>Arabidopsis thaliana</i> BAC T9A4...	212	0.61	1

GenBank AQ329627 AQ329627 nbxb0045010r CUGI Rice BAC Li...	207	0.62	1
GenBank ATT18B16 AL021687 Arabidopsis thaliana DNA chro...	211	0.65	1
GenBank LEU72148 U72148 Lycopersicon esculentum plasma ...	209	0.72	1
GenBank AQ395969 AQ395969 nbxb0065F14f CUGI Rice BAC Li...	204	0.73	1
GenBank ATF18E5 AL022603 Arabidopsis thaliana DNA chro...	209	0.73	1
GenBank AB005238 AB005238 Arabidopsis thaliana genomic ...	208	0.77	1
GenBank AB015477 AB015477 Arabidopsis thaliana genomic ...	208	0.77	1
GenBank ATAC002392 AC002392 Arabidopsis thaliana chromoso...	208	0.77	1
GenBank AB016879 AB016879 Arabidopsis thaliana genomic ...	207	0.81	1
GenBank AB023041 AB023041 Arabidopsis thaliana genomic ...	207	0.81	1
GenBank T4B21 AF118223 Arabidopsis thaliana BAC T4B2...	207	0.81	1
GenBank AC006419 AC006419 *** SEQUENCING IN PROGRESS **...	207	0.81	1
GenBank ATFCA7 Z97342 Arabidopsis thaliana DNA chromo...	207	0.81	1
GenBank ATFCA8 Z97343 Arabidopsis thaliana DNA chromo...	207	0.81	1
GenBank AF050665 AF050665 Spirogyra maxima tRNA-Ile gen...	206	0.83	1
GenBank AB013394 AB013394 Arabidopsis thaliana genomic ...	206	0.84	1
GenBank TM021B04 AF007271 Arabidopsis thaliana BAC TM02...	206	0.84	1
GenBank F1707 AC003671 Arabidopsis thaliana chromoso...	206	0.84	1
GenBank AB012245 AB012245 Arabidopsis thaliana genomic ...	205	0.87	1
GenBank F9K20 AC005679 Arabidopsis thaliana chromoso...	205	0.87	1
GenBank AC006951 AC006951 *** SEQUENCING IN PROGRESS **...	205	0.87	1
GenBank AC004708 AC004708 CIC5B11.1 check: 4870 from: 1...	205	0.87	1
GenBank PTR223621 AJ223621 Populus trichocarpa CCoAOMT1 ...	204	0.87	1
GenBank AB020751 AB020751 Arabidopsis thaliana genomic ...	204	0.90	1
GenBank AB005240 AB005240 Arabidopsis thaliana genomic ...	204	0.90	1
GenBank AC007069 AC007069 *** SEQUENCING IN PROGRESS **...	204	0.90	1
GenBank AC006437 AC006437 *** SEQUENCING IN PROGRESS **...	204	0.90	1
GenBank ATAC003033 AC003033 Arabidopsis thaliana chromoso...	203	0.92	1
GenBank ATAC003673 AC003673 Arabidopsis thaliana chromoso...	203	0.92	1
GenBank ATFCA2 Z97337 Arabidopsis thaliana DNA chromo...	203	0.92	1
GenBank AB006699 AB006699 Arabidopsis thaliana genomic ...	202	0.94	1
GenBank AB016871 AB016871 Arabidopsis thaliana genomic ...	202	0.94	1
GenBank AC006202 AC006202 *** SEQUENCING IN PROGRESS **...	202	0.94	1
GenBank AB006700 AB006700 Arabidopsis thaliana genomic ...	202	0.94	1
GenBank ATAC004077 AC004077 Arabidopsis thaliana chromoso...	202	0.94	1
GenBank F3H7 AF118222 Arabidopsis thaliana BAC F3H7...	202	0.94	1
GenBank ATAC002391 AC002391 Arabidopsis thaliana chromoso...	202	0.94	1
GenBank AF116775 AF116775 Pedinomonas minor mitochondri...	201	0.96	1

Warning: Descriptions of 53 database sequences were not reported due to the limiting value of parameter V = 100.

Homologien zu Y85A6R:

Query Sequence: 85r1_2c.seq gegen PlantDNA (Length: 357)

Database: PlantDNA 229,809 sequences; 211,299,161 total letters.

Sequences producing High-scoring Segment Pairs:	High Score	Smallest Sum	
		High Probability P(N)	N
GenBank D85597 D85597 <i>Oryza australiensis</i> retrotranspo...	1019	9.5e-40	1
GenBank T7M24 AF077408 <i>Arabidopsis thaliana</i> BAC T7M24...	1018	1.3e-39	1
GenBank F5K24 AF128395 <i>Arabidopsis thaliana</i> BAC F5K24...	987	3.3e-38	1
GenBank AQ273042 AQ273042 nbxb0029G09f CUGI Rice BAC Lib...	945	3.0e-37	1
GenBank AQ290781 AQ290781 nbxb0037B12f CUGI Rice BAC Lib...	936	7.2e-37	1
GenBank AQ363799 AQ363799 nbxb0060A11r CUGI Rice BAC Lib...	936	8.1e-37	1
GenBank AQ271602 AQ271602 nbxb0026G02r CUGI Rice BAC Lib...	882	1.6e-34	1
GenBank B26959 B26959 T24F3TR TAMU <i>Arabidopsis thaliana</i> ...	801	1.1e-30	1
GenBank HVBARE1 Z17327 <i>H.vulgare</i> DNA for BARE-1 copia-l...	814	2.0e-30	1
GenBank TAWIS21A X63184 <i>T.aestivum</i> DNA for Wis-2-1A retr...	625	5.9e-22	1
GenBank AQ368070 AQ368070 toxb0001B14r CUGI Tomato BAC L...	336	9.1e-10	1
GenBank AQ290367 AQ290367 nbxb0036J22r CUGI Rice BAC Lib...	329	3.1e-09	1
GenBank ATAC007045 AC007045 <i>Arabidopsis thaliana</i> chromosom...	327	2.2e-08	1
GenBank AQ287432 AQ287432 nbxb0030C22f CUGI Rice BAC Lib...	274	2.1e-06	1
GenBank ATAC006136 AC006136 <i>Arabidopsis thaliana</i> chromosom...	269	9.0e-06	1
GenBank AC006423 AC006423 <i>Arabidopsis thaliana</i> chromosom...	265	1.4e-05	1
GenBank AB019224 AB019224 <i>Arabidopsis thaliana</i> genomic D...	259	2.5e-05	1
GenBank AQ157094 AQ157094 nbxb0008N24r CUGI Rice BAC Lib...	229	0.00022	1
GenBank AQ367321 AQ367321 toxb0002K22f CUGI Tomato BAC L...	196	0.14	1
GenBank THIREP M37239 <i>T.elongatum</i> E genome repetitive ...	197	0.17	1
GenBank ATAC005171 AC005171 <i>Arabidopsis thaliana</i> chromosom...	192	0.48	1
GenBank T15F16 AF076275 <i>Arabidopsis thaliana</i> BAC T15F1...	190	0.59	1
GenBank F20045 F20045 ATTS6084 AC16H <i>Arabidopsis thali</i> ...	176	0.70	1
GenBank T1G11 AC002376 Sequence of BAC T1G11 from Ara...	186	0.82	1
GenBank AQ158800 AQ158800 nbxb0012007r CUGI Rice BAC Lib...	180	0.87	1
GenBank AF061282 AF061282 <i>Sorghum bicolor</i> 22 kDa kafirin...	184	0.91	1
GenBank Z18523 Z18523 ATTS0899 AC16H <i>Arabidopsis thali</i> ...	135	0.995	1

Homologien zu Y89F10L:

Query Sequence: 89f10lco.seq gegen pdb (Length: 510)

Database: PlantDNA 185,527 sequences; 168,664,634 total letters.

	Smallest	Sum	High	Probability
Sequences producing High-scoring Segment Pairs:	Score	P(N)	N	

*** NONE ***

Homologien zu Y89F10R:

Query Sequence: 89f10lrco.seq gegen pdb (Length: 532)

Database: PlantDNA 185,527 sequences; 168,664,634 total letters.

	Smallest	Sum	High	Probability
Sequences producing High-scoring Segment Pairs:	Score	P(N)	N	
GenBank ATAC005727 AC005727 Arabidopsis thaliana chromosom...	218	0.061	1	
GenBank AB006706 AB006706 Arabidopsis thaliana genomic D...	208	0.22	1	
GenBank SRGLB X73283 S.rostrata glb3 gene for leghemo...	201	0.39	1	
GenBank AB016875 AB016875 Arabidopsis thaliana genomic D...	199	0.55	1	
GenBank AQ327469 AQ327469 nbxb0041K01f CUGI Rice BAC Lib...	192	0.67	1	
GenBank B11770 B11770 T24K9-Sp6 TAMU Arabidopsis thali...	191	0.67	1	
GenBank AC002330 AC002330 Arabidopsis thaliana BAC T10P1...	196	0.68	1	
GenBank AQ051567 AQ051567 nbxb0002cA02r CUGI Rice BAC Li...	189	0.70	1	
GenBank AB007646 AB007646 Arabidopsis thaliana genomic D...	194	0.77	1	
GenBank ATFCA7 Z97342 Arabidopsis thaliana DNA chromos...	189	0.87	1	
GenBank AC000348 AC000348 Genomic sequence for Arabidops...	188	0.95	1	
GenBank B11958 B11958 T26G7-Sp6 TAMU Arabidopsis thali...	181	0.98	1	
GenBank AC005275 AC005275 Arabidopsis thaliana BAC F4C21...	185	0.99	1	
GenBank D89717 D89717 Dioscorea burkilliana chloroplas...	180	0.994	1	
GenBank AB017071 AB017071 Arabidopsis thaliana genomic D...	183	0.996	1	
GenBank AB012243 AB012243 Arabidopsis thaliana genomic D...	175	0.998	2	
GenBank B27031 B27031 T26G7TR TAMU Arabidopsis thalian...	172	0.9995	1	
GenBank AC006081 AC006081 *** SEQUENCING IN PROGRESS ***...	180	0.9997	1	
GenBank CUCAA0 D55677 Cucurbita maxima AAO gene for as...	179	0.9998	1	

Homologien zu Y99F8L:

Query Sequence: 99F8Lcon.seq gegen PlantDNA (Length: 503)

Database: PlantDNA 267,401 sequences; 240,832,482 total letters.

Sequences producing High-scoring Segment Pairs:	High Score	Smallest Sum	
		High Probability P(N)	N
GenBank ATAC004705 AC004705 Arabidopsis thaliana chromosom...	283	4.8e-06	1
GenBank ATAC007167 AC007167 Arabidopsis thaliana chromosom...	283	4.8e-06	1
GenBank AQ329591 AQ329591 nbxb0045G14r CUGI Rice BAC Lib...	269	8.8e-05	1
GenBank ATAC006218 AC006218 Arabidopsis thaliana chromosom...	271	0.00019	1
GenBank AQ362453 AQ362453 nbxb0049N14f CUGI Rice BAC Lib...	265	0.00022	1
GenBank BVSATDNAB Z22849 B.vulgaris satellite DNA sequenc...	216	0.00092	1
GenBank AQ159502 AQ159502 nbxb0014G21r CUGI Rice BAC Lib...	244	0.0016	1
GenBank BPNRPROM AJ001725 Betula pendula NR-gene promote...	254	0.0018	1
GenBank T3H13 AF128396 Arabidopsis thaliana BAC T3H13...	254	0.0025	1
GenBank ATAC004401 AC004401 Arabidopsis thaliana chromosom...	252	0.0034	1
GenBank AB022210 AB022210 Arabidopsis thaliana genomic D...	251	0.0038	1
GenBank AQ050116 AQ050116 nbxb0003bD01r CUGI Rice BAC Li...	243	0.0045	1
GenBank PETZFDB1 D26083 Petunia zinc-finger DNA binding ...	245	0.0073	1
GenBank AB015473 AB015473 Arabidopsis thaliana genomic D...	243	0.011	1
GenBank AB024038 AB024038 Arabidopsis thaliana genomic D...	240	0.016	1
GenBank ATAC007120 AC007120 Arabidopsis thaliana chromosom...	239	0.018	1
GenBank AQ574338 AQ574338 nbxb0085G20f CUGI Rice BAC Lib...	234	0.019	1
GenBank AC007662 AC007662 Arabidopsis thaliana chromosom...	238	0.020	1
GenBank GMA011009 AJ011009 Glycine max cytosolic glutamin...	237	0.021	1
GenBank ATAC006929 AC006929 Arabidopsis thaliana chromosom...	237	0.023	1
GenBank B24451 B24451 F20E10TR IGF Arabidopsis thalian...	191	0.024	1
GenBank DCCARSR12 X57171 D.caryophyllus CARSR12 gene. 5/95	236	0.025	1
GenBank LJGLN1 Y12859 L.japonicus gln1, pge1 & krm gen...	236	0.026	1
GenBank AB010077 AB010077 Arabidopsis thaliana genomic D...	235	0.029	1
GenBank ATAC006954 AC006954 Arabidopsis thaliana chromosom...	235	0.029	1
GenBank ATAC006429 AC006429 Arabidopsis thaliana chromosom...	234	0.033	1
GenBank ATAC006420 AC006420 Arabidopsis thaliana chromosom...	234	0.033	1
GenBank ATAC007211 AC007211 Arabidopsis thaliana chromosom...	234	0.033	1
GenBank AI488982 AI488982 EST247321 tomato ovary, TAMU L...	224	0.041	1
GenBank EPFCPCG M81884 Epifagus virginiana chloroplast ...	232	0.042	1
GenBank ATAC005623 AC005623 Arabidopsis thaliana chromosom...	232	0.042	1
GenBank VFLEB6 X14240 Vicia faba VfLEB6 gene. 5/95	230	0.043	1
GenBank ATAC007134 AC007134 Arabidopsis thaliana chromosom...	231	0.048	1
GenBank ATT6K22 AL031187 Arabidopsis thaliana DNA chrom...	231	0.048	1

GenBank GST244887 AJ244887	Gossypium sturtianum partial f...	228	0.048	1
GenBank B09084 B09084	F6L16-T7 IGF Arabidopsis thalian...	226	0.051	1
GenBank B11102 B11102	F19C22-T7 IGF Arabidopsis thaliana...	227	0.052	1
GenBank T15F16 AF076275	Arabidopsis thaliana BAC T15F1...	230	0.054	1
GenBank YUP8H12R AC002986	Arabidopsis thaliana chromosom...	230	0.054	1
GenBank AQ249660 AQ249660	F1E22-Sp6.1 IGF Arabidopsis th...	223	0.057	1
GenBank AB025609 AB025609	Arabidopsis thaliana genomic D...	229	0.061	1
GenBank PWU02970 U02970	Prototheca wickerhamii 263-11 co...	229	0.061	1
GenBank AB016889 AB016889	Arabidopsis thaliana genomic D...	229	0.061	1
GenBank AF069441 AF069441	Arabidopsis thaliana BAC T19B1...	229	0.061	1
GenBank AQ010540 AQ010540	F24D8TRB IGF Arabidopsis thali...	191	0.064	1
GenBank AC007633 AC007633	Arabidopsis thaliana BAC T25P2...	227	0.077	1
GenBank ATU87794 U87794	Arabidopsis thaliana transcripti...	226	0.081	1
GenBank F12F1 AC002131	Arabidopsis thaliana chromosom...	226	0.087	1
GenBank PEALCTN L11745	Pisum sativum lectin (Blec4) gen...	225	0.088	1
GenBank BNSACPD1 X74782	B.napus gene for stearoyl-acyl c...	225	0.090	1
GenBank AQ291042 AQ291042	nbxb0038M01r CUGI Rice BAC Lib...	169	0.092	2
GenBank AB016873 AB016873	Arabidopsis thaliana genomic D...	225	0.096	1
GenBank AB007647 AB007647	Arabidopsis thaliana genomic D...	225	0.097	1
GenBank ATAC005825 AC005825	Arabidopsis thaliana chromosom...	225	0.097	1
GenBank AQ050302 AQ050302	nbxb0003dB09f CUGI Rice BAC Li...	219	0.10	1
GenBank B77836 B77836	T29F12TF TAMU Arabidopsis thaliana...	216	0.11	1
GenBank T27D20 AF076274	Arabidopsis thaliana BAC T27D2...	224	0.11	1
GenBank B24223 B24223	F19G17TR IGF Arabidopsis thalian...	176	0.11	1
GenBank AQ395969 AQ395969	nbxb0065F14f CUGI Rice BAC Lib...	218	0.12	1
GenBank AB023037 AB023037	Arabidopsis thaliana genomic D...	223	0.12	1
GenBank AC005287 AC005287	Arabidopsis thaliana chromosom...	223	0.12	1
GenBank GST244886 AJ244886	Gossypium sturtianum partial f...	220	0.12	1
GenBank AQ050147 AQ050147	nbxb0003bG11f CUGI Rice BAC Li...	216	0.13	1
GenBank ATT6K21 AL021889	Arabidopsis thaliana DNA chrom...	222	0.14	1
GenBank ATAC006248 AC006248	Arabidopsis thaliana chromosom...	222	0.14	1
GenBank CHMPXX X04465	Liverwort Marchantia polymorpha ...	222	0.14	1
GenBank POPHOMT1A D49710	Populus kitakamiensis (P. siebol...	221	0.14	1
GenBank CAU72146 U72146	Camptotheca acuminata 3-hydroxy-...	221	0.15	1
GenBank T2L5 AF096371	Arabidopsis thaliana BAC T2L5....	221	0.15	1
GenBank AB024026 AB024026	Arabidopsis thaliana genomic D...	220	0.17	1
GenBank AB025615 AB025615	Arabidopsis thaliana genomic D...	220	0.17	1
GenBank ATAC006161 AC006161	Arabidopsis thaliana chromosom...	220	0.17	1
GenBank AC007576 AC007576	Arabidopsis thaliana chromosom...	219	0.19	1
GenBank ATFCA2 Z97337	Arabidopsis thaliana DNA chromos...	219	0.19	1
GenBank LESSRSPG Z34518	L.esculentum (cv. Rentita) mRNA ...	218	0.20	1
GenBank AF079499 AF079499	Glycine max alcohol-dehydrogen...	217	0.21	1
GenBank AQ251286 AQ251286	F20023-T7 IGF Arabidopsis thal...	169	0.22	1

GenBank ATAC007210 AC007210 Arabidopsis thaliana chromosom...	217	0.23	1
GenBank ATAC006224 AC006224 Arabidopsis thaliana chromosom...	217	0.23	1
GenBank ATAC006298 AC006298 Arabidopsis thaliana chromosom...	217	0.23	1
GenBank AB009048 AB009048 Arabidopsis thaliana genomic D...	217	0.23	1
GenBank ATAC006919 AC006919 Arabidopsis thaliana chromosom...	217	0.23	1
GenBank ATAC005170 AC005170 Arabidopsis thaliana chromosom...	217	0.23	1
GenBank ATAC005315 AC005315 Arabidopsis thaliana chromosom...	217	0.23	1
GenBank AQ331051 AQ331051 nbxb0048L03r CUGI Rice BAC Lib...	168	0.24	1
GenBank GST244888 AJ244888 Gossypium sturtianum partial f...	214	0.24	1
GenBank AB025641 AB025641 Arabidopsis thaliana genomic D...	216	0.26	1
GenBank AC005359 AC005359 REVERSE-COMPLEMENT OF: F23J3.G...	216	0.26	1
GenBank AQ325844 AQ325844 nbxb0021H04r CUGI Rice BAC Lib...	211	0.26	1
GenBank AB008190 AB008190 Brassica rapa gene for SLG29, ...	215	0.27	1
GenBank T24M8 AF077409 Arabidopsis thaliana BAC T24M8...	215	0.29	1
GenBank AC005850 AC005850 Arabidopsis thaliana chromosom...	215	0.29	1
GenBank ATF20B18 AL049483 Arabidopsis thaliana DNA chrom...	215	0.29	1
GenBank ATAC006260 AC006260 Arabidopsis thaliana chromosom...	214	0.32	1
GenBank LEAGP1G X99147 L.esculentum AGP-1g gene. 1/97	212	0.34	1
GenBank AB028610 AB028610 Arabidopsis thaliana genomic D...	213	0.35	1
GenBank AC006535 AC006535 Genomic sequence for Arabidops...	213	0.35	1
GenBank AQ331069 AQ331069 nbxb0048L21r CUGI Rice BAC Lib...	207	0.35	1
GenBank AB013393 AB013393 Arabidopsis thaliana genomic D...	212	0.38	1
GenBank AB019228 AB019228 Arabidopsis thaliana genomic D...	212	0.38	1

Warning: Descriptions of 202 database sequences were not reported due to the limiting value of parameter V = 100.

Homologien zu Y99F8R:

Query Sequence: 99F8R_co.seq gegen PlantDNA (Length: 522)

Database: PlantDNA 193,568 sequences; 177,206,427 total letters.

		Smallest	
		Sum	
	High	Probability	
Sequences producing High-scoring Segment Pairs:	Score	P(N)	N
GenBank ATT18B16 AL021687 Arabidopsis thaliana DNA chromo...	217	0.17	1
GenBank AB005239 AB005239 Arabidopsis thaliana genomic DN...	202	0.66	1
GenBank AQ163410 AQ163410 nbxb0006N18r CUGI Rice BAC Libr...	190	0.89	1
GenBank AQ249305 AQ249305 T20I13-Sp6.1 TAMU Arabidopsis t...	191	0.91	1
GenBank AB015477 AB015477 Arabidopsis thaliana genomic DN...	192	0.97	1
GenBank B08878 B08878 F10C11-T7 IGF Arabidopsis thalian...	187	0.98	1

GenBank AQ368064 AQ368064	toxb0001B08r CUGI Tomato BAC Li...	184	0.99	1
GenBank AQ364798 AQ364798	nbxb0061J17r CUGI Rice BAC Libr...	185	0.992	1
GenBank AB023029 AB023029	Arabidopsis thaliana genomic DN...	188	0.996	1
GenBank AC002329 AC002329	DNA sequence of Arabidopsis tha...	188	0.996	1
GenBank AC005489 AC005489	Genomic sequence for Arabidopsi...	187	0.998	1
GenBank AQ327362 AQ327362	nbxb0040H06r CUGI Rice BAC Libr...	182	0.999	1
GenBank ATFCA4 Z97339	Arabidopsis thaliana DNA chromoso...	185	0.9996	1

Homologien zu Y101A7L:

Query Sequence: 101L1_2c.seq gegen PlantDNA (Length: 802)

Database: PlantDNA 213,936 sequences; 198,770,223 total letters.

Sequences producing High-scoring Segment Pairs:	Score	High Probability	Smallest	
			P(N)	N
GenBank SOYSUBI2 D26092	244	0.034	1	
GenBank ATAC006232 AC006232	212	0.75	1	
GenBank T9A4 AF096373	200	0.994	1	
GenBank ATF24G24 AL049488	200	0.994	1	
GenBank F5I14 AC001229	194	0.99993	1	

Homologien zu Y101A7R:

Query Sequence: 101r1_2c.seq gegen PlantDNA (Length: 435)

Database: PlantDNA 229,809 sequences; 211,299,161 total letters.

Sequences producing High-scoring Segment Pairs:	Score	High Probability	Smallest	
			P(N)	N
GenBank AQ287549 AQ287549	567	3.2e-20	1	
GenBank B67376 B67376	560	9.6e-20	1	
GenBank AQ156983 AQ156983	550	1.9e-19	1	
GenBank ATAC006136 AC006136	568	2.8e-19	1	
GenBank AQ287794 AQ287794	541	4.8e-19	1	
GenBank AQ292143 AQ292143	541	4.9e-19	1	
GenBank AQ365497 AQ365497	541	5.1e-19	1	
GenBank AQ051479 AQ051479	537	6.5e-19	1	

GenBank AQ362490 AQ362490 nbxb0050E05f CUGI Rice BAC Lib...	537	7.3e-19	1
GenBank AB025636 AB025636 Arabidopsis thaliana genomic D...	544	3.4e-18	1
GenBank AF058826 AF058826 Arabidopsis thaliana BAC T26D2...	544	3.4e-18	1
GenBank T27D20 AF076274 Arabidopsis thaliana BAC T27D2...	541	4.6e-18	1
GenBank ATAC006420 AC006420 Arabidopsis thaliana chromosom...	497	4.5e-16	1
GenBank B22383 B22383 F19E7TF IGF Arabidopsis thaliana...	455	3.9e-15	1
GenBank AC007293 AC007293 Arabidopsis thaliana 'TAMU' BA...	437	2.3e-13	1
GenBank AC007178 AC007178 Arabidopsis thaliana 'IGF' BAC...	437	2.3e-13	1
GenBank AQ365799 AQ365799 nbxb0064B17r CUGI Rice BAC Lib...	402	1.0e-12	1
GenBank AQ271394 AQ271394 nbxb0025P05r CUGI Rice BAC Lib...	385	5.5e-12	1
GenBank AF069441 AF069441 Arabidopsis thaliana BAC T19B1...	382	7.1e-11	1
GenBank T7M24 AF077408 Arabidopsis thaliana BAC T7M24...	381	7.8e-11	1
GenBank AQ365761 AQ365761 nbxb0064M14r CUGI Rice BAC Lib...	316	8.3e-09	1
GenBank B23299 B23299 F28B2TR IGF Arabidopsis thaliana...	274	1.2e-06	1
GenBank B22227 B22227 F17N4TF IGF Arabidopsis thaliana...	244	0.00056	1
GenBank ATM3E9 AL022223 Arabidopsis thaliana DNA chrom...	195	0.85	1
GenBank AI485804 AI485804 EST244125 tomato ovary, TAMU L...	174	0.998	1

Homologien zu Y102H12L:

Query Sequence: 10211_2c.seq gegen PlantDNA (Length: 1141)

Database: PlantDNA 229,809 sequences; 211,299,161 total letters.

		Smallest		
		Sum		
		High	Probability	
Sequences producing High-scoring Segment Pairs:	Score	P(N)	N	
GenBank AC006837 AC006837 Arabidopsis thaliana 'IGF' BAC...	721	3.4e-26	1	
GenBank AC007261 AC007261 Arabidopsis thaliana 'IGF' BAC...	714	7.1e-26	1	
GenBank ATAC006570 AC006570 Arabidopsis thaliana chromosom...	714	7.1e-26	1	
GenBank ATAC006420 AC006420 Arabidopsis thaliana chromosom...	705	1.8e-25	1	
GenBank ATT4F9 AL049523 Arabidopsis thaliana DNA chrom...	699	3.4e-25	1	
GenBank AC007231 AC007231 Arabidopsis thaliana 'IGF' BAC...	697	4.2e-25	1	
GenBank ATAC006528 AC006528 Arabidopsis thaliana chromosom...	691	7.8e-25	1	
GenBank AB018121 AB018121 Arabidopsis thaliana genomic D...	689	9.6e-25	1	
GenBank F3H7 AF118222 Arabidopsis thaliana BAC F3H7....	689	9.6e-25	1	
GenBank ATAC006955 AC006955 Arabidopsis thaliana chromosom...	687	1.2e-24	1	
GenBank ATAC006218 AC006218 Arabidopsis thaliana chromosom...	679	2.7e-24	1	
GenBank AC005142 AC005142 Arabidopsis thaliana BAC T5L23...	674	4.6e-24	1	
GenBank AQ367652 AQ367652 toxb0002F10r CUGI Tomato BAC L...	652	4.9e-24	1	
GenBank ATAC006419 AC006419 Arabidopsis thaliana chromosom...	668	8.5e-24	1	
GenBank AC007399 AC007399 Arabidopsis thaliana BAC F14I2...	665	1.2e-23	1	

GenBank AC006268 AC006268	Arabidopsis thaliana BAC T24G2...	662	1.6e-23	1
GenBank F5K24 AF128395	Arabidopsis thaliana BAC F5K24...	662	1.6e-23	1
GenBank AB011478 AB011478	Arabidopsis thaliana genomic D...	661	1.7e-23	1
GenBank AQ367763 AQ367763	tox0001A08r CUGI Tomato BAC L...	621	1.0e-22	1
GenBank AC007155 AC007155	Arabidopsis thaliana 'IGF' BAC...	638	6.7e-21	1
GenBank AF058825 AF058825	Arabidopsis thaliana BAC F7N22...	628	2.8e-20	1
GenBank AC006436 AC006436	Arabidopsis thaliana 'IGF' BAC...	626	3.7e-20	1
GenBank AQ367350 AQ367350	tox0002004r CUGI Tomato BAC L...	559	1.8e-19	1
GenBank AQ049832 AQ049832	nbxb0001bB12r CUGI Rice BAC Li...	418	5.6e-18	2
GenBank AQ326651 AQ326651	nbxb0038C01r CUGI Rice BAC Lib...	428	1.1e-17	2
GenBank AC007120 AC007120	Arabidopsis thaliana 'TAMU' BA...	576	1.7e-17	1
GenBank AF061282 AF061282	Sorghum bicolor 22 kDa kafirin...	576	1.7e-17	1
GenBank AQ367373 AQ367373	tox0001G23f CUGI Tomato BAC L...	501	1.0e-16	1
GenBank AQ272519 AQ272519	nbxb0028I05f CUGI Rice BAC Lib...	493	2.5e-16	1
GenBank AQ368193 AQ368193	tox0001L24r CUGI Tomato BAC L...	492	3.6e-16	1
GenBank AQ274194 AQ274194	nbxb0034C06r CUGI Rice BAC Lib...	490	3.7e-16	1
GenBank AQ363956 AQ363956	nbxb0060017r CUGI Rice BAC Lib...	492	3.9e-16	1
GenBank AQ272160 AQ272160	nbxb0027H21r CUGI Rice BAC Lib...	488	5.8e-16	1
GenBank AQ288279 AQ288279	nbxb0032H08r CUGI Rice BAC Lib...	485	6.2e-16	1
GenBank AQ367658 AQ367658	tox0002F18f CUGI Tomato BAC L...	481	1.2e-15	1
GenBank AQ291576 AQ291576	nbxb0039M09f CUGI Rice BAC Lib...	476	2.2e-15	1
GenBank AQ156986 AQ156986	nbxb0008D10r CUGI Rice BAC Lib...	474	2.5e-15	1
GenBank AQ291296 AQ291296	nbxb0038D08r CUGI Rice BAC Lib...	472	2.7e-15	1
GenBank AQ289530 AQ289530	nbxb0035I20f CUGI Rice BAC Lib...	468	3.8e-15	1
GenBank AQ365788 AQ365788	nbxb0064B07f CUGI Rice BAC Lib...	471	3.9e-15	1
GenBank AB014738 AB014738	Oryza sativa gypsy-type retrot...	501	5.7e-15	2
GenBank AQ362941 AQ362941	nbxb0051C10f CUGI Rice BAC Lib...	457	1.6e-14	1
GenBank AQ365323 AQ365323	nbxb0063H23f CUGI Rice BAC Lib...	456	1.7e-14	1
GenBank AQ288469 AQ288469	nbxb0033M15r CUGI Rice BAC Lib...	456	1.7e-14	1
GenBank AQ292273 AQ292273	nbxb0025O09r CUGI Rice BAC Lib...	456	1.9e-14	1
GenBank AQ159250 AQ159250	nbxb0013O21f CUGI Rice BAC Lib...	456	1.9e-14	1
GenBank AQ290176 AQ290176	nbxb0036O08r CUGI Rice BAC Lib...	454	2.4e-14	1
GenBank AQ258318 AQ258318	nbxb0020I24r CUGI Rice BAC Lib...	448	4.4e-14	1
GenBank ACY12432 Y12432	A.comosus DNA for Ty3/gypsy LTR ...	502	4.9e-14	1
GenBank AQ367510 AQ367510	tox0002H05f CUGI Tomato BAC L...	443	8.1e-14	1
GenBank AQ367493 AQ367493	tox0002F07f CUGI Tomato BAC L...	443	8.1e-14	1
GenBank AQ290884 AQ290884	nbxb0021F01f CUGI Rice BAC Lib...	432	2.3e-13	1
GenBank AB014740 AB014740	Oryza sativa gypsy-type retrot...	489	2.6e-13	1
GenBank AB021952 AB021952	AB021952 Oryza sativa ms-bo-Ta...	475	5.6e-13	1
GenBank AF111709 AF111709	Oryza sativa subsp. indica Ret...	474	8.9e-13	2
GenBank AQ259840 AQ259840	nbxb0024B05f CUGI Rice BAC Lib...	375	9.6e-13	2
GenBank AB014741 AB014741	Oryza sativa gypsy-type retrot...	475	1.2e-12	1
GenBank ATAC006437 AC006437	Arabidopsis thaliana chromosom...	472	2.0e-12	1

GenBank AQ291876 AQ291876	nxbx0040M19r	CUGI Rice BAC Lib...	440	2.8e-12	1
GenBank AQ291783 AQ291783	nxbx0040A09r	CUGI Rice BAC Lib...	440	3.0e-12	1
GenBank AQ259963 AQ259963	nxbx0007C12r	CUGI Rice BAC Lib...	402	6.3e-12	1
GenBank AQ328809 AQ328809	nxbx0043J16r	CUGI Rice BAC Lib...	427	2.1e-11	1
GenBank AF050455 AF050455	Zea mays gypsy/Ty3-type	retrot...	445	3.5e-11	1
GenBank AQ258652 AQ258652	nxbx0020P24f	CUGI Rice BAC Lib...	387	3.2e-10	1
GenBank AF060596 AF060596	Gossypium barbadense	clone pXP...	361	5.3e-10	1
GenBank AQ156722 AQ156722	nxbx0008G18f	CUGI Rice BAC Lib...	341	4.8e-09	1
GenBank LHDEL X13886	Lilium henryi del	transposon. 3/91	398	5.6e-09	1
GenBank AQ273423 AQ273423	nxbx0030G09r	CUGI Rice BAC Lib...	336	8.1e-09	1
GenBank AQ396109 AQ396109	nxbx0067I08f	CUGI Rice BAC Lib...	356	1.8e-08	1
GenBank AQ256733 AQ256733	nxbx0016D20r	CUGI Rice BAC Lib...	364	3.2e-08	1
GenBank AQ367487 AQ367487	toxb0002F01f	CUGI Tomato BAC L...	325	5.8e-07	1
GenBank CAA006003 AJ006003	Cicer arietinum gypsy	like ele...	290	4.1e-05	1
GenBank AC007125 AC007125	Arabidopsis thaliana	BAC T13D4...	300	0.00022	1
GenBank AF078801 AF078801	Hordeum vulgare	degenerate ret...	263	0.011	1
GenBank AB006702 AB006702	Arabidopsis thaliana	genomic D...	247	0.061	1
GenBank AQ273233 AQ273233	nxbx0029D09f	CUGI Rice BAC Lib...	228	0.20	1

Homologien zu Y102H12R:

Query Sequence: 102r1_3c.seq gegen PlantDNA (Length: 833)

Database: PlantDNA 193,568 sequences; 177,206,427 total letters.

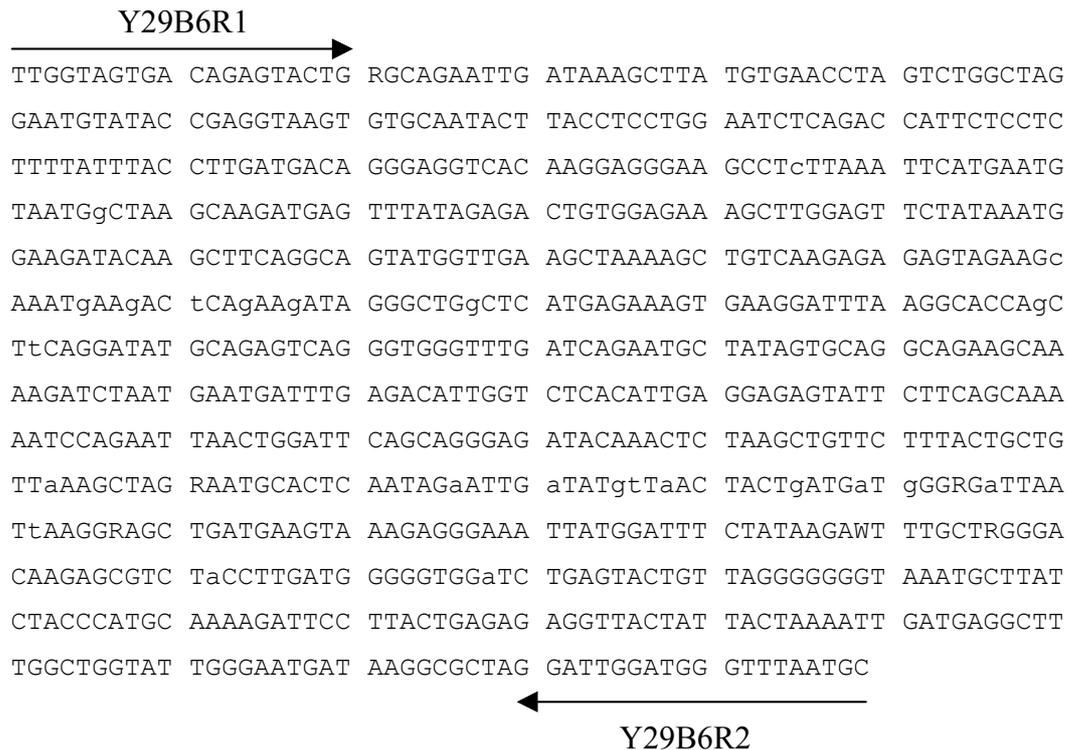
			High	Smallest	
			Score	Sum	
Sequences producing High-scoring Segment Pairs:				High Probability	
				P(N)	N
GenBank STBIIMPP X80235	S.tuberosum mRNA for beta-II MP...	1218	3.7e-50	1	
GenBank STBIMPP X80237	S.tuberosum mRNA for beta-I MPP...	1158	1.8e-47	1	
GenBank AA660734 AA660734	00625 MtrRHE Medicago truncatu...	1125	1.7e-45	1	
GenBank DCU47097 U47097	Daucus carota glycine-rich prot...	251	4.9e-05	1	
GenBank LEEXTEN5 X55685	Tomato extensin mRNA (clone uG-...	294	5.6e-05	1	
GenBank CRARG7 X16619	Chlamydomonas reinhardtii ARG7 ...	304	5.7e-05	1	
GenBank B19165 B19165	F22B11-Sp6 IGF Arabidopsis thal...	269	0.0014	1	
GenBank AQ248413 AQ248413	AK012 Genomic DNA Hordeum vul...	222	0.0015	1	
GenBank C19860 C19860	Rice cDNA, partial sequence (E1...	218	0.0024	1	
GenBank B18516 B18516	F20N19-T7 IGF Arabidopsis thali...	263	0.0027	1	
GenBank TOMEXTENA M76670	L.esculentum extensin (class I)...	259	0.0067	1	
GenBank AQ329816 AQ329816	nxbx0045F10f CUGI Rice BAC Li...	250	0.0087	1	
GenBank LEEXTEN1 X55681	Tomato extensin mRNA (clone w17...	237	0.0093	1	
GenBank B19505 B19505	T12K17-T7 TAMU Arabidopsis thal...	248	0.0093	1	

GenBank B21437 B21437 T9K15-Sp6 TAMU Arabidopsis thal...	249	0.0095	1
GenBank LEEXTEN X55684 Tomato extensin mRNA (clone uG)...	251	0.010	1
GenBank B20603 B20603 T20C11-Sp6 TAMU Arabidopsis tha...	249	0.011	1
GenBank B18696 B18696 T17L16-T7.1 TAMU Arabidopsis th...	248	0.013	1
GenBank B19863 B19863 T16L9-Sp6 TAMU Arabidopsis thal...	245	0.020	1
GenBank B19583 B19583 F1I14-T7 IGF Arabidopsis thalia...	240	0.022	1
GenBank B18833 B18833 F13M6-Sp6 IGF Arabidopsis thali...	242	0.024	1
GenBank B19100 B19100 T7O11-Sp6 TAMU Arabidopsis thal...	241	0.027	1
GenBank B20466 B20466 T25O18-T7 TAMU Arabidopsis thal...	235	0.048	1
GenBank B19246 B19246 F16B24-T7 IGF Arabidopsis thali...	232	0.074	1
GenBank C74426 C74426 Rice cDNA, partial sequence (E3...	184	0.086	1
GenBank B20149 B20149 T27N21-T7 TAMU Arabidopsis thal...	230	0.086	1
GenBank VURNEXT26 X86030 V.unguiculata mRNA for extensin...	229	0.089	1
GenBank B18855 B18855 F18E20-Sp6 IGF Arabidopsis thal...	229	0.10	1
GenBank VUEXT26GN X91836 V.unguiculata Ext26G gene. 1/97	233	0.11	1
GenBank B18579 B18579 F16P13-Sp6 IGF Arabidopsis thal...	227	0.14	1
GenBank AQ248412 AQ248412 AK011 Genomic DNA Hordeum vul...	180	0.16	1
GenBank AQ362766 AQ362766 nbxb0051C09f CUGI Rice BAC Li...	222	0.21	1
GenBank AB016882 AB016882 Arabidopsis thaliana genomic ...	227	0.23	1
GenBank B11616 B11616 F17O7-T7 IGF Arabidopsis thalia...	224	0.24	1
GenBank AB019229 AB019229 Arabidopsis thaliana genomic ...	225	0.28	1
GenBank B19261 B19261 T14I6-T7 TAMU Arabidopsis thali...	217	0.35	1
GenBank AQ290187 AQ290187 nbxb0036O24f CUGI Rice BAC Li...	215	0.37	1
GenBank ATF1N20 AL022140 Arabidopsis thaliana DNA chro...	220	0.43	1
GenBank B13338 B13338 F24K23-Sp6 IGF Arabidopsis thal...	215	0.44	1
GenBank SOYHRGPC L22031 Soybean hydroxyproline-rich gly...	192	0.49	1
GenBank B20206 B20206 T22G16-T7 TAMU Arabidopsis thal...	208	0.51	1
GenBank B10264 B10264 F14G23-Sp6.2 IGF Arabidopsis th...	215	0.52	1
GenBank B19304 B19304 F1C9-T7 IGF Arabidopsis thalian...	211	0.56	1
GenBank B12621 B12621 F24K11-Sp6.2 IGF Arabidopsis th...	212	0.59	1
GenBank B19686 B19686 F5H12-T7.1 IGF Arabidopsis thal...	209	0.60	1
GenBank B21178 B21178 F28M21-T7 IGF Arabidopsis thali...	208	0.66	1
GenBank AQ327068 AQ327068 nbxb0040A14f CUGI Rice BAC Li...	206	0.67	1
GenBank AQ258436 AQ258436 nbxb0020J13f CUGI Rice BAC Li...	205	0.72	1
GenBank B20848 B20848 T30E11-T7 TAMU Arabidopsis thal...	204	0.84	1
GenBank B19508 B19508 T13I5-T7 TAMU Arabidopsis thali...	202	0.84	1
GenBank B21011 B21011 F12H21-Sp6.1 IGF Arabidopsis th...	204	0.84	1
GenBank B09155 B09155 T19A2-Sp6 TAMU Arabidopsis thal...	203	0.87	1
GenBank LEEXTEN13 X55693 Tomato mRNA for a glycine-rich ...	191	0.89	1
GenBank LEEXTEN14 X55694 Tomato extensin mRNA (clone w10...	191	0.89	1
GenBank VCPHEROPH Y07752 V.carteri mRNA for pherophorin-...	205	0.90	1
GenBank B20684 B20684 T18G19-Sp6 TAMU Arabidopsis tha...	201	0.90	1
GenBank AF078934 AF078934 Glycine max mariner element S...	206	0.90	1

GenBank B18581 B18581	F10F5-Sp6	IGF Arabidopsis thali...	202	0.91	1
GenBank B20822 B20822	T26K15-T7	TAMU Arabidopsis thal...	201	0.92	1
GenBank TAU30323 U30323	Triticum aestivum beta	1,3-gluc...	204	0.93	1
GenBank B22087 B22087	T2D1-T7	TAMU Arabidopsis thalia...	198	0.95	1
GenBank B19178 B19178	F23E18-T7	IGF Arabidopsis thali...	199	0.95	1
GenBank B20111 B20111	T6P10-T7	TAMU Arabidopsis thali...	198	0.97	1
GenBank B19476 B19476	T5O16-T7	TAMU Arabidopsis thali...	195	0.98	1
GenBank AQ329913 AQ329913	nbxb0045P10f	CUGI Rice BAC Li...	196	0.98	1
GenBank B21659 B21659	F10E17-Sp6	IGF Arabidopsis thal...	196	0.98	1
GenBank AQ363063 AQ363063	nbxb0053J01f	CUGI Rice BAC Li...	196	0.98	1
GenBank B19308 B19308	F1G9-T7	IGF Arabidopsis thalian...	196	0.99	1
GenBank B19207 B19207	F8E8-T7	IGF Arabidopsis thalian...	196	0.99	1
GenBank B18512 B18512	F20D2-T7	IGF Arabidopsis thalia...	194	0.993	1
GenBank B12884 B12884	T16N7-Sp6	TAMU Arabidopsis thal...	195	0.997	1
GenBank CREVSP3A L29029	Chlamydomonas reinhardtii	VSP-3...	196	0.998	1
GenBank B20843 B20843	T29H15-T7	TAMU Arabidopsis thal...	193	0.998	1
GenBank B19487 B19487	T7F17-T7	TAMU Arabidopsis thali...	190	0.998	1
GenBank B21566 B21566	F25B24-Sp6.1	IGF Arabidopsis th...	192	0.999	1
GenBank RICS3132A D40938	Rice cDNA, partial sequence	(S3...	146	0.9990	1
GenBank B18534 B18534	T3D3-Sp6	TAMU Arabidopsis thali...	192	0.9991	1
GenBank B18844 B18844	F8P20-Sp6	IGF Arabidopsis thali...	191	0.9993	1
GenBank AQ288990 AQ288990	nbxb0034A01f	CUGI Rice BAC Li...	189	0.9994	1
GenBank B18601 B18601	F9H21-Sp6	IGF Arabidopsis thali...	191	0.9996	1
GenBank B20996 B20996	T2K23-T7	TAMU Arabidopsis thali...	190	0.9997	1
GenBank B21673 B21673	F17I11-Sp6	IGF Arabidopsis thal...	190	0.9997	1
GenBank B18225 B18225	T24A20-T7.1	TAMU Arabidopsis th...	189	0.9999	1
GenBank B09053 B09053	F19C23-Sp6	IGF Arabidopsis thal...	189	0.99992	1
GenBank B08270 B08270	F3G17-Sp6.1	IGF Arabidopsis tha...	190	0.99994	1

8.5 STS-Marker Y29B6R (Klon-Bank-Nr. 2424)

Mit den Primern Y29B6R1 und Y29B6R2 wurde nur ein Amplifikat bei *bb*-Pflanzen erhalten. Die entsprechende Sequenz ist in 5'→3'-Orientierung angegeben. Die Primer sind als Pfeile dargestellt.



8.7 STS-Marker Y89F10L (Klon-Bank-Nr. 2426)

Der Sequenzvergleich des *B*- (89L_BB) und *b*-spezifischen (89L_bb) Amplifikats zeigt nur einen Basenaustausch (*). Der für *B*-spezifische Primer (Y89F10L9A) ist als gestrichelter Pfeil, der *b*-spezifische (Y89F10L9B) und der Gegenprimer (Y89F10L2) sind als durchgezogene Pfeile dargestellt. Die Sequenzen sind in 5'→3'-Orientierung angegeben.

```

89L-BB  CATGAAATCC ACAGCATCAC CAAGAAACTG CAAAAGAACG TCACGAATAA GAGGTAATTA
89L-bb  CATGAAATCC ACAGCATCAC CAAGAAACTG CAAAAGAACG TCACGAATAA GAGGTAATTA

89L-BB  CACTAATCAA ATCTTTGGAC TTCTGTTTGA CCTTTACCTT TCATATTAAT GGTGCTCGTT
89L-bb  CACTAATCAA ATCTTTGGAC TTCTGTTTGA CCTTTACCTT TCATATTAAT GGTGCTCGTT

89L-BB  CTTAAATCAG TTCCTCCTGA AACAGAAGTA GATGATTCAG CTTTGATTAC CGAAGTATCT
89L-bb  CTTAAATCAG TTCCTCCTGA AACAGAAGTA GATGATTCAG CTTTGATTAC CGAAGTATCT

89L-BB  TCTCTCAACT CCAAGCAGCC ATCATCAGAG ACATTGGCTG ATTCTCCAGA TGCGTCAATA
89L-bb  TCTCTCAACT CCAAGCAGCC ATCATCAGAG ACATTGGCTG ATTCTCCAGA TGCGTCAATA

89L-BB  CCATCCTTTT CAGACAATGG AACCGGAAAT GTGCGCAATT TGGGAACCTT CTCCCCTTTT
89L-bb  CCATCCTTTT CAGACAATGG AACCGGAAAT GTGCGCAATT TGGGAACCTT CTCCCCTTTT

89L-BB  CCTTCAACCG CAACGAATCC ATTCACTGAT GCTTCATAGC TTGAATCATT TGAACATCC
89L-bb  CCTTCAACCG CAACGAATCC ATTCACTGAT GCTTCATAGC TTGAATCATT TGAACATCC
                                     Y89F10L9A
                                     -----
                                     Y89F10L9B

89L-BB  .....▶ AGTACCATTG ATTTATTTAT CTTGTATTCA TGTAATGGCT TCTCCTTTTC ATTGGATGGT
89L-bb  AGTTCATTG ATTTATTTAT CTTGTATTCA TGTAATGGCT TCTCCTTTTC ATTGGATGGT
      *
      ─▶
89L-BB  GTCACAGGAG CTATGGAATC TGGAAGGCTC TCAACAAAAC CATCTGGCAA AGAATCCACT
89L-bb  GTCACAGGAG CTATGGAATC TGGAAGGCTC TCAACAAAAC CATCTGGCAA AGAATCCACT
                                     ←
                                     Y89F10L2

```