

Schriftenreihe des Institutes für Pflanzenbau

Band 5/2004

Birgit Blank

**Integration neuer molekularer Marker
in die *Tm-2a*-Region der Tomate**

D 98 (Diss. Universität Bonn)

Shaker Verlag
Aachen 2004

Bibliografische Information der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

Zugl.: Bonn, Univ., Diss., 2004

Copyright Shaker Verlag 2004

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 3-8322-3197-8

ISSN 1619-9456

Shaker Verlag GmbH • Postfach 101818 • 52018 Aachen

Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9

Internet: www.shaker.de • eMail: info@shaker.de

5 Zusammenfassung

Pflanzen-Pathogen-Interaktionen zeichnen sich häufig durch eine spezifische Wechselwirkung von pathogeneigenen Avirulenzgenen (*avr*-Gen) mit entsprechenden pflanzeigenen Resistenzgenen (*R*-Gen) aus. Dieses Prinzip wurde in der Gen-für-Gen-Hypothese ausgedrückt (Flor 1971) und beschreibt, dass ein bestimmtes *R*-Gen bei Anwesenheit des korrespondierenden *avr*-Gens im angreifenden Pathogen der Pflanze Resistenz vermittelt. Die Isolierung und Charakterisierung von *R*- und den korrespondierenden *avr*-Genen trägt daher unmittelbar zum Verständnis der pflanzlichen Pathogenabwehr bei.

Tomaten können über kleine Verletzungen sowohl durch Tabakmosaikviren (TMV) als auch Tomatenmosaikviren (ToMV) infiziert werden. Charakteristisches Merkmal einer Tabak- bzw. Tomatenmosaikvirose ist die mosaikartige Scheckung der Blätter. In der Folge der Erkrankung kommt es zu Einbußen in der Fruchtqualität und im Ertrag.

In Tomate sind bislang drei Gene bekannt, die Resistenz gegen TMV und ToMV vermitteln und ursprünglich aus Wildtomatenarten stammen. Dies sind zum einen *Tm-1* auf Chromosom 2 und zum anderen *Tm-2*- und *Tm-2a* auf Chromosom 9 in Nähe des Zentromers. Von diesen drei Genen verleiht vor allem *Tm-2a* stabile und vollständige Resistenz gegen natürlich vorkommende TMV- und ToMV-Rassen. *Tm-2a* wird dominant vererbt und stellt ein *R*-Gen im Sinne der Gen-für-Gen-Hypothese dar. Das korrespondierende *avr*-Genprodukt ist das virale Transportprotein, welches das Virus zur Verbreitung innerhalb der infizierten Pflanze benötigt. Die Klonierung des *Tm-2a*-Gens ist ein erster Schritt, um langfristig die molekularen Mechanismen dieser Resistenzantwort zu verstehen.

Die Positionsklonierung bzw. kartengestützte Klonierung ermöglicht die Isolierung eines Gens aufgrund seiner Lokalisation in einer genetischen Karte. Die Tomate ist seit vielen Jahren ein Objekt intensiver Forschung. Entsprechend sind Kopplungskarten mit hoher Markerdichte, sowie genomische DNA- und cDNA-Bibliotheken als Voraussetzung für einen kartengestützten Klonierungsansatz vorhanden. Die vorliegende Arbeit ist Teil des Projektes zur Isolierung des *Tm-2a*-Gens mit Hilfe der kartengestützten Klonierung.

Basierend auf einer *L. peruvianum*-Population, entstanden aus der Kreuzung einer heterozygot resistenten (Rr) Pflanze als weiblicher Elter (Akzessionen PI 128650) mit einer homozygot suszeptiblen (rr) Pflanze als Pollenspender (PI 128657), erstellten Pillen et al. (1996a) eine 4,3 cM lange Feinkarte der *Tm-2a*-Region. Nach Erstellung zweier YAC-Contigs aus einer genomischen DNA-Bibliothek mit Hilfe der engsten *Tm-2a*-gekoppelten Marker zeigte sich, dass die Rekombinationsfrequenz in der *Tm-2a*-Region mit einem Wert von mehr als 6.800 kb/cM ($\emptyset$ in Tomate circa 750 kb/cM nach Tanksley et al. 1992) stark supprimiert ist. Um die Klonierung des *Tm-2a*-Gens zukünftig zu ermöglichen, sollte gemäß der "chromosome landing"-Strategie nach Tanksley et al. (1995) eine Ultrafeinkarte der *Tm-2a*-Region erstellt werden. Entsprechend waren die Ziele der vorliegenden Arbeit (1) die Anreicherung der *Tm-2a*-Region mit AFLP- und SSR-Markern, (2) die Identifizierung neuer Rekombinationsereignisse, (3) die Integration des vorhandenen R12-Contigs in die Ultrafeinkarte und (4) die Konvertierung der engsten *Tm-2a*-flankierenden sowie -kosegregierenden AFLP-Marker in STS-Marker für ihren Einsatz als Anker zur Isolierung weiterer DNA-Abschnitte aus einer genomischen DNA-Bibliothek.

In einer "bulked segregant"-Analyse wurden 83 neue AFLP-Marker und ein SSR-Marker in der *Tm-2a*-Region identifiziert. Nach Analyse in der DNA von 77 Rekombinanten aus der Arbeit von Pillen et al. (1996a) und einer aus der vorliegenden Arbeit wurden die Marker in die Feinkarte integriert. Der SSR-Marker TMS45 wurde im 0,5-cM-Intervall zwischen dem TG207-Cluster und TG101 positioniert (zur Übersicht siehe Abb. 8, S. 54). Zehn AFLP-Marker kosegregierten mit *Tm-2a* und wurden daher als Kandidaten für die Konvertierung in STS- oder RFLP-Marker ausgewählt, um als Anker zur Identifizierung korrespondierender DNA-Abschnitte aus genomischen DNA-Bibliotheken zu dienen. Auf dem langen Arm des Chromosoms kosegregierten weitere 30 Marker mit TMS45, 32 mit dem TG207-Cluster und sieben Marker lagen zwischen RAP101 und CD3. Auf dem kurzen Arm des Chromosoms wurden vier AFLP-Marker identifiziert, jedoch außerhalb der Feinkarte. Mit Hilfe einer Kopplungsanalyse in 96 Nachkommen der beschriebenen *L. peruvianum*-Kreuzung wurde der genetische Abstand dieser vier Marker zur *Tm-2a*-Region bestimmt. Einer dieser Marker, AFLp48, wurde in einen schnell und einfach zu analysierenden SNP-Marker umgewandelt und in einem "high throughput"-Screen nach neuen Rekombinationsereignissen als *Tm-2a*-flankierender Marker auf dem kurzen Chromosomenarm eingesetzt.

Für die Konvertierung ausgewählter AFLP-Marker in andere Markerklassen wurden zunächst die Sequenzen der AFLP-Markerbanden ermittelt und von diesen spezifische PCR-Primer abgeleitet. Bis auf den Marker AFLp60 wurden alle AFLP-Sequenzen mit den entwickelten STS-Primern amplifiziert. Anschließend wurden DNA-Polymorphismen identifiziert, um die genetische Lokalisation der neuen STS-Marker mit den ursprünglichen AFLP-Loci zu verifizieren. Zudem wurde überprüft, ob die mit *Tm-2a*-kosegregierenden Marker bereits auf einem der bestehenden YAC-Contigs enthalten sind. Eine Abschätzung der Kopienzahl der isolierten Sequenzen im Tomatengenom erfolgte in einer Southern-Analyse.

Für die Marker AFL03 und AFL32 war direkt nach PCR mit den abgeleiteten STS-Primern ein DNA-Polymorphismus zwischen TMV-resistenten (PCR-Bande anwesend) und TMV-suszeptiblen Pflanzen (DNA-Bande abwesend) nachweisbar. RFLPs wurden für AFL39 und AFL72 gefunden, für AFL48 wurden in einer vergleichenden BESS-Analyse 8 SNPs identifiziert. Diese fünf Marker konnten genetisch bzw. physikalisch an ihrem Ursprungslocus kartiert werden.

Aufgrund fehlender DNA-Polymorphismen war für die verbleibenden fünf Marker eine genetische Kartierung nicht möglich. Jedoch zeigten AFL40 und AFL75 in der physikalischen Analyse mit Hilfe von YAC-Klonen Signale auf dem TG207-Contig, auf dem aber nicht der ursprüngliche *Tm-2a*-Locus kartiert. Beide Sequenzen sind bis auf eine Base innerhalb der Erkennungssequenz der selektiven AFLP-Primer identisch und kommen in hoher Kopienzahl im Tomatengenom vor. Zudem zeigen sie 95 % Homologie mit einem Bereich des *copia*-ähnlichen Retrotransposons ToRTL1 auf Chromosom 2 der Tomate. Zusammen deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass AFLp40 und AFLp75 von retroviralen Sequenzen abstammen und an mehreren Loci im Tomatengenom vorkommen.

Zur Bestimmung der Abfolge der neuen Marker und genetischen Begrenzung der bestehenden YAC-Contigs wurde eine Suche nach neuen Rekombinationsereignissen in der beschriebenen *L. peruvianum*-Population durchgeführt. Zunächst wurden 1.395 Pflanzen der mit Hilfe des *Tm-2a*-flankierenden Markerpaares TG207sts und TG589sts analysiert und eine Rekombinante identifiziert. Eine zusätzlich durchgeführte Kartierung der beiden zur Verfügung gestellten STS-Marker ergab, dass TG589sts, welcher von dem RFLP-Marker TG589 abgeleitet wurde, nicht am ursprünglichen Locus kartiert, sondern auf einem zweiten Locus nahe dem TG207-Cluster. Aufgrund dieser Position war TG589sts ungeeignet als Screening-Marker.

Im nachfolgenden zweistufigen „high throughput“-Screen wurden in der ersten Stufe der SSR-Marker TMS45 und der von AFL48 abgeleitete SNP-Marker SNP-48 eingesetzt, beides Marker, die sich für eine einfache und schnelle Analyse auf dem DNA-Sequenzierautomaten eignen. Von 3.984 analysierten *L. peruvianum*-Pflanzen zeigten 166 Rekombinationen in der Zielregion und wurden in der zweiten Stufe zur Eingrenzung der Zielregion mit dem RFLP-Marker TG589 analysiert. Keine der ausgewählten Pflanzen zeigte ein Rekombinationsereignis in unmittelbarer Nähe von *Tm-2a*. Damit war weder die Erstellung einer Ultrafeinkarte durch die Separierung der neu identifizierten Marker mit Hilfe zusätzlicher Rekombinationsereignisse, sowie die genetische Begrenzung der YAC-Contigs möglich.

Eine Suppression der Rekombination, wie sie auch in der *Tm-2a*-Region vorliegt, wird häufig in Zentromerbereichen sowie angrenzendem perizentrischen Heterochromatin beobachtet. Daraus resultiert ein ungünstiges Verhältnis von geringer genetischer zu großer physikalischer Distanz zwischen zwei Loci. Dies erschwert die Isolierung eines Gens mit Hilfe einer kartengestützten Klonierungsstrategie, da in diesem Fall nicht genügend Rekombinationsereignisse in physikalischer Nähe des Zielgens identifiziert werden können. Zur Isolierung von Genen in rekombinationssupprimierten Regionen könnte die Strategie des „transposon tagging“ eine Alternative zur Positionsklonierung darstellen.