

*Institut für Pflanzenbau  
Professur für Speziellen Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung*

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

**Inaugural-Dissertation**

zur  
Erlangung des Grades

Doktor der Agrarwissenschaften  
(Dr. agr.)

der  
Hohen Landwirtschaftlichen Fakultät  
der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
zu Bonn

vorgelegt am  
26.05.2004

von  
Dipl.-Biol. Birgit Blank

aus  
Laupheim

Referent: Prof. Dr. Jens Léon

Koreferent: Prof. Dr. Richard A. Sikora

Tag der mündlichen Prüfung: 17.09.2004

Gedruckt bei: Shaker Verlag

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](http://www.shaker.de) • eMail: [info@shaker.de](mailto:info@shaker.de)

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

In Tomate sind drei Gene bekannt - *Tm-1*, *Tm-2* und *Tm-2a* - die Resistenz gegen Tabakmosaikviren (TMV) und Tomatenmosaikviren (ToMV) vermitteln. Vor allem *Tm-2a* bewirkt eine stabile und vollständige Resistenz gegen natürlich vorkommende TMV- und ToMV-Rassen. *Tm-2a* liegt in Nähe des Zentromers auf Chromosom 9 der Tomate und stammt ursprünglich aus der Wildtomatenart *Lycopersicon peruvianum*. Um die molekularen Mechanismen der *Tm-2a*-vermittelten Resistenz zu verstehen, soll das Gen mit Hilfe der kartengestützten Klonierung isoliert werden.

Zu diesem Zweck wurden die Vorarbeiten von Pillen et al. (1996a) weitergeführt, um eine Ultrafeinkarte der *Tm-2a*-Region zu erstellen. Dafür wurde die Zielregion unter Einsatz einer „bulked segregant“-Analyse mit insgesamt 83 AFLP- und einem SSR-Marker angereichert. Diese Marker wurden mit Hilfe von 77 rekombinanten Individuen von Pillen et al. (1996a) und einer in dieser Arbeit identifizierten Rekombinante in die bestehende *Tm-2a*-Feinkarte integriert. Um die zehn mit *Tm-2a* cosegregierenden AFLP-Marker als Anker zur Isolierung korrespondierender DNA-Abschnitte nutzen zu können, wurden diese in STS- oder RFLP-Marker konvertiert. Für vier dieser Marker gelang die Identifizierung eines DNA-Polymorphismus und die Bestätigung der ursprünglichen chromosomal Position. Die Sequenzen von zwei weiteren Markern kommen in hoher Kopienzahl im Tomatengenom vor und sind Teil retroviraler Sequenzen. Für drei weitere Marker konnte kein Polymorphismus identifiziert werden, bei einem Marker misslang die Konvertierung. Für den Einsatz in der nachfolgenden Suche nach Rekombinationssereignissen wurde ein AFLP-Marker auf dem kurzen Arm von Chromosom 9 in einen SNP-Marker konvertiert.

Um die Reihenfolge der neuen Marker zu bestimmen und die bestehenden YAC-Contigs in der *Tm-2a*-Region genetisch zu begrenzen, wurde eine Suche nach neuen Rekombinationssereignissen in einer von Pillen et al. (1996a) erstellten *L. peruvianum*-Population durchgeführt. In einer 1.395 Individuen umfassenden Suche ("miniscreen") wurde eine rekombinante Pflanze identifiziert. In der nachfolgenden zweistufigen Suche ("high throughput"-Screen) wurden insgesamt 3.984 *L. peruvianum*-Pflanzen analysiert, wovon keine ein Rekombinationssereignis in unmittelbarer Nähe von *Tm-2a* zeigte. Die Erstellung einer Ultrafeinkarte der *Tm-2a*-Region war aufgrund fehlender Rekombinationssereignisse nicht möglich.

Die geringe Anzahl an identifizierten Rekombinationssereignissen trotz Analyse mehrerer tausend Individuen lässt sich auf die häufig beobachtete Suppression der Rekombination in Zentromerbereichen zurückführen. Das daraus resultierende Verhältnis von geringer genetischer zu großer physikalischer Distanz erschwert die Isolierung eines Genes mit Hilfe der kartengestützten Klonierung. Hier könnte die Strategie des „transposon tagging“ eine Alternative zur kartengestützten Klonierung darstellen.

## **Integration of new molecular markers into the *Tm-2a* region of tomato**

Three known genes - *Tm-1*, *Tm-2*, and *Tm-2a* – confer resistance against TMV (tobacco mosaic virus) and ToMV (tomato mosaic virus) in tomato. Of these genes, *Tm-2a* provides the most stable resistance against naturally occurring strains of TMV or ToMV. *Tm-2a* is localized near the centromere of chromosome 9 of tomato and originates from the wild species *Lycopersicon peruvianum*. In order to elucidate the molecular mechanisms of *Tm-2a* mediated resistance, it is intended to isolate the corresponding gene using a map based cloning strategy.

To follow this approach, the preexisting work done by Pillen et al. (1996a) was continued to generate an ultra high resolution map of the *Tm-2a* region. Using the strategy of a "bulked segregant"-analysis, the candidate region was enriched by 83 AFLP markers and one SSR marker. These markers were integrated to the existing high resolution map by analysis in the DNA of 77 recombinant individuals identified by Pillen et al. (1996a) and one recombinant plant identified in the present work. Ten AFLP markers cosegregating with the *Tm-2a* locus were converted to STS or RFLP markers to use them as anchors for the isolation of corresponding genomic DNA fragments. Four of these markers were polymorphic and their original chromosomal position could be verified. The sequences of two additional markers were frequently found in the tomato genome and display homology to retroviral DNA sequences. No polymorphisms were identified for three more markers, the conversion of another marker failed. One AFLP marker located on the short arm of chromosome 9 was converted to a SNP marker for its application in the subsequent screen for recombination events.

This recombination screen was performed in a *L. peruvianum* population established by Pillen et al. (1996a) to define the order of the new identified markers and to determine the genetic boundaries of the existing YAC contigs. A "miniscreen" of 1.395 plants revealed one recombinant individual. In a subsequent two level "high throughput"-screen a total number of 3.984 *L. peruvianum* plants were analyzed but no recombination event was found in direct neighborhood of the *Tm-2a* locus. The lack of recombination events prevented the generation of an ultra high resolution map of the *Tm-2a* region.

The observed low recombination frequency, despite the analysis of thousands of individuals, can be explained by a suppression of recombination frequently found in pericentromeric regions. The resulting ratio of low genetic distance to large physical distance complicates the isolation of genes by map based cloning. In this case the strategy of transposon tagging can offer an alternative approach.

**Inhaltsverzeichnis**

	<u>Seite</u>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Resistenz in Pflanzen.....	3
1.1.1 Inkompatible Interaktion .....	4
1.1.2 Gen-für-Gen Hypothese.....	5
1.1.3 <i>R</i> -Gene .....	6
1.2 Das Pathosystem TMV - Tomate.....	7
1.2.1 TMV.....	8
1.2.2 TMV-Resistenzgene in Tomate .....	9
1.3 Genklonierung.....	10
1.3.1 Kartengestützte Klonierung (= Positionscloning) .....	11
1.3.2 Genetische Kartierung .....	13
1.3.2.1 Molekulare Marker.....	14
1.3.2.2 "Bulked segregant"-Analyse.....	17
1.3.3 Physikalische Kartierung .....	18
1.3.3.1 "Chromosome walking" und "Chromosome landing" .....	18
1.3.4 Isolierung und Verifikation von Kandidatengenen.....	20
1.4 Grundlagen und Ziele der Arbeit .....	20
1.4.1 Grundlagen und Ausgangssituation .....	20
1.4.2 Ziele der Arbeit .....	22
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>25</b>
2.1 Material .....	25
2.1.1 Pflanzenmaterial .....	25
2.1.2 Pflanzen-DNA .....	25
2.1.3 Viren, Bakterien und Plasmide .....	26
2.1.4 YAC-Klone .....	26
2.1.5 Primer und Oligonukleotide .....	27
2.1.6 SSR-Marker.....	27
2.1.7 Enzyme .....	28

**Inhaltsverzeichnis**

	<u>Seite</u>
2.1.8 Chemikalien .....	28
2.1.9 Puffer, Lösungen und Medien.....	28
2.2 Methoden .....	29
2.2.1 TMV-Resistenztest .....	29
2.2.1.1 Inokulation von Tomatenpflanzen .....	29
2.2.1.2 Tabak-Bioessay .....	29
2.2.2 DNA-Extraktion aus Tomate .....	30
2.2.2.1 DNA-MaxiPrep .....	30
2.2.2.2 DNA-MikroPrep .....	30
2.2.2.3 DNA-ExpressPrep .....	31
2.2.3 Extraktion von Hefe-DNA (Hefe-DNA-MiniPrep) .....	31
2.2.4 Agarosegelelektrophorese.....	32
2.2.5 Polyacrylamidgelelektrophorese.....	32
2.2.5.1 Polyacrylamidgele mit anschließender Silberfärbung .....	32
2.2.5.2 Polyacrylamidgele für den DNA-Sequenzierautomaten.....	33
2.2.6 Southern Analyse .....	33
2.2.6.1 Southern Blot .....	33
2.2.6.2 Nicht-radioaktive DNA-DNA-Hybridisierung .....	34
2.2.6.3 DNA-Markierung mit Digoxigenin.....	34
2.2.7 DNA-Marker-Techniken .....	34
2.2.7.1 AFLP .....	35
2.2.7.2 SSR-Marker .....	35
2.2.7.3 STS-Marker .....	36
2.2.7.4 RFLP-Marker .....	36
2.2.8 Fragmentanalyse auf dem DNA-Sequenzierautomaten.....	37
2.2.9 DNA-Sequenzierung .....	38
2.2.10 BESS (Base Excision Sequence Scanning).....	39
2.2.11 Reamplifikation von DNA-Fragmenten.....	41

**Inhaltsverzeichnis**

	<u>Seite</u>
2.2.12 Klonierung von DNA-Fragmenten .....	41
2.2.12.1 Ligation.....	41
2.2.12.2 Transformation .....	42
2.2.12.3 PCR-basierte Charakterisierung von Klonen .....	42
2.2.13 Plasmid Miniprep aus <i>E. coli</i> .....	43
2.2.14 "Bulked segregant"-Analyse.....	43
2.2.15 PCR-Programme .....	45
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>49</b>
3.1 Neue molekulare Marker in der <i>Tm-2a</i> -Region der Tomate.....	49
3.1.1 Identifizierung von SSR-Markern in der <i>Tm-2a</i> -Region .....	49
3.1.2 Identifizierung von AFLP-Markern in der <i>Tm-2a</i> -Region.....	52
3.1.3 Identifizierung von AFLP-Markern auf dem kurzen Arm von Chromosom 9 .....	56
3.1.4 Kopplungsanalyse zur Integration der AFLP-Marker auf dem kurzen Arm von Chromosom 9 .....	57
3.1.4.1 Nicht-radioaktive RFLP-Analysen mit dem Digoxigenin (DIG)-System.....	57
3.1.4.2 Durchführung der Kopplungsanalyse .....	58
3.2 Konvertierung von AFLP-Markern in STS- oder RFLP-Marker .....	59
3.2.1 Reamplifikation der AFLP-Marker-Fragmente .....	60
3.2.2 Klonierung und Charakterisierung der AFLP-Marker-Fragmente .....	61
3.2.3 Ermittlung der Consensussequenzen und Primerdesign .....	62
3.2.4 Identifizierung von DNA-Polymorphismen .....	64
3.2.5 Kartierung der STS-Marker .....	70
3.3 Screening nach Rekombinationsereignissen in der <i>Tm-2a</i> -Region.....	71
3.3.1 "Miniscreen".....	72
3.3.2 "High throughput"-Screen .....	72
3.3.2.1 Rekombinantenscreen mit den Markern SNP48 und TMS45 ....	73

**Inhaltsverzeichnis**

	<u>Seite</u>
3.3.2.2 Feinanalyse der Rekombinationsereignisse mit dem RFLP-Marker TG589 .....	75
3.4 Erstellung einer Ultrafeinkarte der <i>Tm-2a</i> -Region .....	76
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>79</b>
4.1 Identifizierung von DNA-Markern in der <i>Tm-2a</i> -Region .....	79
4.1.1 "Bulked segregant"-Analyse .....	79
4.1.2 Anreicherung der <i>Tm-2a</i> -Region mit neuen DNA-Markern .....	81
4.2 Konvertierung von DNA-Markern .....	84
4.2.1 Strategie der Konvertierung .....	85
4.2.2 Detektion von DNA-Polymorphismen .....	86
4.2.3 Kartierung von konvertierten Markern .....	88
4.3 Identifizierung von Rekombinationsereignissen in der <i>Tm-2a</i> -Region .....	91
4.3.1 Einflussfaktoren der Rekombination .....	92
4.3.2 Suppression der Rekombination in zentromernahen Regionen .....	94
4.4 Kartengestützte Klonierung von Genen in Regionen supprimierter Rekombination .....	96
<b>5 Zusammenfassung .....</b>	<b>99</b>
<b>6 Literatur .....</b>	<b>103</b>
<b>7 Anhang .....</b>	<b>119</b>
7.1 Primer- und Oligonukleotidsequenzen .....	119
7.1.1 AFLP-Adaptoren .....	119
7.1.2 AFLP-Präamplifikationsprimer .....	119
7.1.3 Selektive AFLP-Primer .....	119
7.1.4 Primer für STS-Marker .....	120
7.1.5 Primer für SSR-Marker .....	120
7.1.6 Sonstige Primer .....	121
7.2 Sequenzen der AFLP-Marker .....	121